

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**THÈSE PRÉSENTÉE À
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE**

**PAR
ABDELLAH MENIKH**

**Rôle du digalactosyldiacylglycérol (DGDG) dans l'empilement des
thylacoïdes et dans l'activité du photosystème II**

Juillet 1994

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

Résumé

Dans les organismes photosynthétiques, l'utilisation de l'énergie solaire par le photosystème II (PSII) est sûrement l'aspect le plus fondamental dans la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Cette transformation a lieu dans une organelle spécialisée, le chloroplaste, constituée de deux membranes topologiquement et fonctionnellement différentes. La membrane interne forme des structures applaties, appelées disques thylacoïdiens, attachées à des membranes non empilées appelées membranes stromatiques.

Les membranes des thylacoïdes des chloroplastes sont constituées de lipides non ioniques, le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG), de lipides anioniques, le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et le phosphatidylglycérol (PG), et de lipides zwitterioniques, la phosphatidylcholine (PC). Malgré le nombre considérable de travaux concernant la participation de ces lipides dans l'adhésion réversible des membranes des thylacoïdes et dans l'activité du photosystème II, leur rôle n'a pas encore été élucidé d'une manière claire (Webb et Green, 1991). En particulier, on connaît très peu les mécanismes de l'intervention des lipides non ioniques au niveau du fonctionnement et de l'organisation du photosystème II (Gounaris et al, 1983, Matsuda et al, 1983). Cette question est traitée dans ce travail par le biais d'un lipide non ionique, le digalactosyldiacylglycérol.

La première partie de ce travail concerne la participation des forces attractives et répulsives aux interfaces eau-lipide et lipide-lipide. Dans ce contexte, nos résultats montrent la grande efficacité des ions

Ca^{2+} , comparativement aux ions Mg^{2+} et Na^+ , dans la promotion de l'agrégation des vésicules du DGDG. Par ailleurs, Les résultats d'encapsulation des fluorophores et de la réversibilité de la turbidité excluent toute fusion possible entre les vésicules lipidiques du DGDG.

Cette étude nous a montré également que la perturbation de la polarité de l'interface galactolipide-eau par les sels est un des facteurs majeurs qui déterminent l'agrégation des vésicules de DGDG.

Le site^s d'interaction le plus probable des cations monovalents et divalents avec la tête polaire des lipides a été proposé. Ce site est situé plus particulièrement au groupement COC de l'anneau de sucre.

Le modèle lipidique proposé dans ce travail nous a donné une nouvelle vision sur la configuration adoptée par la tête polaire de lipide, c'est-à dire sur sa tendance à former une liaison hydrogène entre l'hydroxyle de carbone 6 de l'anomère- α du galactose avec le groupement ester sn_2 .

La deuxième partie de ce travail concerne l'étude de l'effet de DGDG et de MgCl_2 sur le recouvrement de l'activité photosynthétique des particules de PSII. Nous avons observé que le DGDG stimule l'activité de dégagement d'oxygène du PSII et que cette activité est liée, d'une part, au rapport lipide/protéine, et, d'autre part, à la présence de MgCl_2 dans le milieu d'incubation. Les modifications structurales qui sont à l'origine de l'interaction lipide-protéines ont été analysées par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Les spectres FTIR montrent un changement conformationel du complexe PSII-DGDG, manifesté par une augmentation de la structure non ordonnée au détriment de la structure en

hélice- α . L'effet de 12 mM MgCl_2 sur le complexe PSII-DGDG est clairement mis en évidence par une modification des pourcentages des structures secondaires des protéines.

Remerciement

Mes remerciements vont en premier lieu au professeur M. Fragata mon directeur de thèse et en deuxième lieu à tous les professeurs et collègues du CRP.

Mes remerciements vont également à tous qui ont contribué de près ou de loin à la bonification de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Un merci particulier au gouvernement Algérien pour la bourse de détachement et au gouvernement canadien pour la bourse poste-doctorale du CRSNG.

Je suis reconnaissant à ma famille pour sa patience durant toutes mes années d'étude j'apprécie profondément son support moral.

Liste des abréviations

ADP	adénosine diphosphate
ATP	adénosine triphosphate
b	déformation
CCL	complexe capteur de lumière (LHC)
Chl	chlorophylle
Cyt	cytochrome
DCBQ	2,5-dichloro-p-benzoquinone
DGDG	digalactosyldiacylglycérol
DMPG	dimyristoylphosphatidylglycérol
DPA	acide dipicolonique
FTIR	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
Hepes	acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthane sulfonique
HPLC	high pressure liquid chromatography
ib	déformation dans le plan
i/e	interne/externe
i r	infrarouge
LHCII	Complexe capteur de lumière du PSII
Mes	acide 2[N-morpholino]éthanesulfonique
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PC	phosphatidylcholine
PG	phosphatidylglycérol
Phéo	phéophytine
PQ	plastoquinone

PSII	photosystème II
PSII-DGDG	particules de photosystème II incorporées dans les vésicules du digalactosyldiacylglycérol
P680	pigment capteur de la lumière du centre réactionnel du photosystème II
s	élongation
Tes	acide N-tris[hydroxyméthyl]-méthyl-2-aminoéthane sulfonique
Tris, Trizma	tris (hydroxy-méthyl) aminométhane
uv	ultraviolet
Z	tyrosine.

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	ii
Remerciements.....	v
Liste des abréviations.....	vi
Liste des figures.....	xii
Liste des tableaux.....	xvi

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. Photosynthèse et organisation de la membrane des thylacoïdes.....	1
1.2. Absorption de l'énergie lumineuse et transport des électrons.....	3
1.3. Composition lipidique de la membrane des thylacoïdes.....	7
1.4. Dispersion lipidique dans un milieu aqueux.....	12
1.5. Empilement de la membrane des thylacoïdes.....	14
1.6. Définition des objectifs	15

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Produits chimiques et méthodes de purification et d'analyse.....	18
2.1.1. Produits chimiques.....	18

2.1.2. Purification des sels et du DGDG.....	20
2.1.3. Analyse chimique des chaînes acyles du DGDG.....	21
2.2. Méthodes préparatives.....	22
2.2.1. Préparation des vésicules de DGDG.....	22
(a) Méthode préparative pour des études d'agrégation.....	22
(b) Méthode préparative pour des études de fusion.....	23
2.2.2. Extraction du PSII et reconstitution membranaire.....	24
2.3. Techniques de mesure.....	26
2.3.1. Méthodes spectroscopiques.....	26
(a) Spectroscopie de fluorescence.....	26
(b) Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	30
(c) Turbidimétrie.....	33
2.3.2 Mesures de la fusion et de l'agrégation membranaire.....	34
(a) Fusion.....	34
(b) Agrégation et réversibilité d'agrégation.....	41
2.3.3 Mesure du dégagement d'oxygène par polarographie.....	42

CHAPITRE III

INTERACTIONS CATIONS-DGDG ET DGDG-DGDG

3.1. Introduction.....	44
3.2. Résultats expérimentaux.....	46
3.2.1. Détermination du type d'interaction entre vésicules de DGDG.....	46

(a) Etude de la fusion des vésicules de phosphatidylsérine.....	46
(b) Démonstration de l'absence de fusion des vésicules de DGDG.....	49
(c) Agrégation et réversibilité d'agrégation des vésicules de DGDG.....	50
3.2.2. Etude des interactions cations-DGDG et DGDG-DGDG par spectroscopie infrarouge.....	54
(a) Modes vibrationnels du DGDG.....	54
1. Modes vibrationnels du galactose et du glycérol.....	54
2. Région de déformation des résidus de glycérol et de galactose dans le DGDG ($1500-1200\text{ cm}^{-1}$).....	58
3. Région d'élongation des résidus de glycérol et de galactose dans le DGDG ($1200-1000\text{ cm}^{-1}$).....	59
4. Région de carbonyle de l'ester du DGDG ($1750-1710\text{ cm}^{-1}$).....	60
(b) Effets des ions sur les modes vibrationnels du DGDG.....	63
3.3 Etude Théorique.....	67
3.3.1 Modélisation de la molécule du DGDG à l'aide de la méthode de la minimisation de l'énergie.....	67
3.3.2 Effets du champ électrique créé par les cations divalents sur le groupement carbonyle de l'ester sn2	70
3.3.3 Perturbation de la polarité de l'interface DGDG-eau.....	74
3.4. Discussion.....	78

Chapitre IV

INTERACTION LIPIDE-PHOTOSYSTEME II

4.1. Introduction.....	85
4.1.1. Organisation moléculaire du PSII.....	85
4.1.2. Interaction lipides-protéines dans le PSII.....	87
4.1.3. Etude par spectrtoscopie infrarouge.....	90
(a) Modes vibrationnels des liaisons peptidiques.....	90
(b) Modes vibrationnels du PSII.....	92
4.2. Résultats expérimentaux	
4.2.1. Effets du DGDG et du $MgCl_2$ sur l'activité du PSII.....	95
4.2.2. Modes vibrationnels du PSII et du complexe PSII-DGDG en absence et en présence des sels.....	98
(a) Modes vibrationnels du PSII.....	98
(b) Modes vibrationnels du complexe PSII-DGDG.....	100
(c) Effets des sels sur les modes vibrationnels du complexe PSII-DGDG.....	104
4.3. Simulation des spectres infrarouge dans la région amide I.....	105
4.4. Discussion.....	113

CHAPITRE V

CONCLUSION.....	117
------------------------	------------

BIBLIOGRAPHIE.....	121
---------------------------	------------

Liste des figures

<u>Figures</u>	<u>Page</u>
Figure 1.1	Structure du chloroplaste.....2
Figure 1.2	Structure imagée de la membrane des thylacoïdes.....5
Figure 1.3	Transport d'électrons dans la membrane photosynthétique.....6
Figure 1.4	Structure chimique des principaux lipides de la membrane des thylacoïdes (a) MGDG; (b) DGDG; (c) SQDG; (d) PG; (e) PC.....10
Figure 2.1	Chromatogramme de la purification du DGDG par HPLC. La phase mobile est constituée d'un mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (70:30:2). A, DGDG. B, impuretés.....19
Figure 2.2	Diagramme d'énergie d'une molécule et mécanismes possibles de la dissipation de l'énergie d'excitation.....28
Figure 2.3	(a) Interféromètre de Michelson utilisé dans un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier; (b) Interférogramme détecté; (c) Spectre obtenu après traitement de l'interferogramme par transformée de Fourier; (A) Amplificateur; (BS) Séparateur de faisceau; (D) Détecteur; (L) Distance parcourue par le faisceau réfléchi (M) Miroir mobile; (M1) Miroir fixe; (Sa) Porte

	échantillon; (S) Source de radiation; (x) Déplacement de miroir mobile.....	31
Figure 2.4	Les différentes étapes possibles dans la fusion membranaire. (a) vésicules séparées dans une suspension aqueuse; (b) vésicules agrégées; (c) étape intermédiaire avant fusion; (d) fusion complète.....	35
Figure 2.5	Spectre d'absorption du TbCl_3 (4 μM) dans une solution de 0.2 M NaCl, 2 mM L-histidine et 2 mM Tes.....	37
Figure 2.6	Spectre d'absorption du DPA (40 μM) dans une solution de 0.2 M NaCl et 2 mM L-histidine et 2 mM Tes.....	38
Figure 2.7	Spectre d'absorption d'un mélange de 4 μM TbCl_3 et 40 μM DPA dans une solution de 0.2 M NaCl, 2 mM L-histidine et 2 mM Tes.....	39
Figure 2.8	Spectres de fluorescence de 2 ml de: (a) 10 mM TbCl_3 , 2 mM Tes, 100 mM acide citrique, 2 mM L-histidine, 0.2 mM NaCl; (b) 100 mM DPA, 2 mM Tes, (c) mélange 1:1 de deux solutions précédentes.....	40
Figure 3.1	Fusion des vésicules de DGDG et de PS sous l'effet des cations divalents (o) CaCl_2 , (o) MgCl_2	48
Figure 3.2	Turbidité à 600 nm des vésicules de DGDG. (o) CaCl_2 ; (o) MgCl_2 ; (Δ) NaCl.....	51
Figure 3.3	Turbidité directe (a) et inverse (b) des vésicules	

	de DGDG dans l'eau deutérée.....	53
Figure 3.4	Structure chimique de la molécule de DGDG.....	55
Figure 3.5	Spectres d'absorption ir du DGDG et du galactose dans D_2O (A) spectres d'absorption; (D) spectres de dérivée seconde.....	56
Figure 3.6	Dérivée seconde des spectres d'absorption ir du DGDG dans D_2O entre $1800-1650\text{ cm}^{-1}$. Figure insérée: Spectres d'absorption ir du DGDG dans D_2O entre $1780-1680\text{ cm}^{-1}$. (a) Sans sel; (b) 18 mM NaCl; (c) 18 mM $MgCl_2$; (d) 10 mM $CaCl_2$	61
Figure 3.7	Spectres normalisés d'absorption ir des vésicules du DGDG dans D_2O . (a) Sans sel; (b) 10 mM $CaCl_2$; (c) 18 mM $MgCl_2$. Figure insérée: simulation de l'enveloppe spectrale (a).....	62
Figure 3.8	Minimisation énergétique de la molécule de DGDG obtenue par le champ de force MM2.....	69
Figure 3.9	Variation de la constante diélectrique à l'interface DGDG-eau en présence de: 18 mM $MgCl_2$, 10 mM $CaCl_2$. Figure insérée: variation de la constante diélectrique à l'interface PC-eau en fonction de différentes concentrations de cations monovalents.....	77
Figure 4.1	Représentation schématique du centre réactionnel du PSII.....	86

Figure 4.2	Orientation spatiale de la liaison peptidique (a) et modes de vibration d'amide (b).....	91
Figure 4.3	Spectre d'absorption ir des membranes de PSII.....	93
Figure 4.4	Diagramme représentant l'effet du DGDG sur le dégagement d'oxygène des particules de PSII et du complexe PSII-DGDG (a) Sans sel; (b) 10 mM MgCl ₂	96
Figure 4.5	Spectres d'absorption ir des polypeptides de PSII et du complexe PSII-DGDG entre 1800-900 cm ⁻¹ . (a) PSII; (b) PSII+DGDG; (c) PSII+DGDG+4 mM CaCl ₂ ; (d) PSII+DGDG+12 mM CaCl ₂	99
Figure 4.6	Spectres d'absorption ir des polypeptides de PSII et du complexe PSII-DGDG entre 1800-900 cm ⁻¹ . (a) PSII; (b) PSII+DGDG; (c) PSII+DGDG+4 mM MgCl ₂ ; (d) PSII+DGDG+12 mM MgCl ₂	103
Figure 4.7	Simulation spectrale de la région de l'amide I du PSII (a) et du complexe PSII-DGDG (b).....	108
Figure 4.8	simulation spectrale de la région de l'amide I du PSII (a) et du complexe PSII-DGDG (b).....	111

Liste des tableaux

<u>Tableaux</u>	<u>Page</u>
Tableau 1.1 Distribution, en pourcentage, des lipides dans la membrane des thylacoïdes.....	8
Tableau 1.2 Composition, en pourcentage, des chaînes acyles des cinq principaux lipides de la membrane des thylacoïdes.....	11
Tableau 1.3 Dispersion des lipides de la membrane des thylacoïdes dans un milieu aqueux.....	13
Tableau 3.1 Fréquences caractéristiques des bandes infrarouges du glycérol, du galactose et du digalactosyldiacylglycérol.....	57
Tableau 3.2 Effets des sels sur les fréquences d'absorption ir de la tête polaire du digalactosyldiacylglycérol.....	64
Tableau 3.3 Étude par spectroscopie ir de l'effet des cations sur la tête polaire du digalactosyldiacylglycérol.....	65
Tableau 3.4 Effet des sels sur l'intensité intégrale (%A) et la fréquence d'absorption maximale de l'ester lié (sn ₂).....	71
Tableau 4.1 Effet de différentes concentrations de CaCl ₂ sur les polypeptides du complexe PSII-DGDG étudié par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	101

Tableau 4.2	Effet de différentes concentrations de MgCl_2 sur les polypeptides du complexe PSII-DGDG étudié par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	102
Tableau 4.3	Résumé des bandes détectées par simulation spectrale.....	109
Tableau 4.4	Effet de sels sur les pourcentages des structures de l'amide I du PSII-DGDG.....	112

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. Photosynthèse et organisation de la membrane des thylacoïdes

La photosynthèse est le mécanisme par lequel les plantes et les algues vertes convertissent l'énergie lumineuse solaire en énergie chimique. Globalement, l'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle a (Chl a) est utilisée dans la photolyse de l'eau et dans la réduction du gaz carbonique en provenance de l'atmosphère. Dans ce procédé, le phosphate inorganique forme un ester avec l'adénosine diphosphate (ADP) pour donner l'adénosine triphosphate (ATP). Ce dernier sera utilisé conjointement avec le NADPH dans la réduction du CO_2 via le cycle de Calvin (Arnon, 1987).

L'organite cellulaire (Figure 1.1) où ces réactions ont lieu est le chloroplaste. Ce dernier est entouré de deux membranes topologiquement et fonctionnellement distinctes, séparées l'une de l'autre par un espace de 10 à 20 nm. À l'intérieur du chloroplaste on trouve un réseau complexe de structures membranaires fermées qu'on nomme membranes des thylacoïdes. On distingue deux types de membranes des thylacoïdes selon qu'elles soient empilées (thylacoïdes granaires) ou non-empilées (thylacoïdes stromatiques).

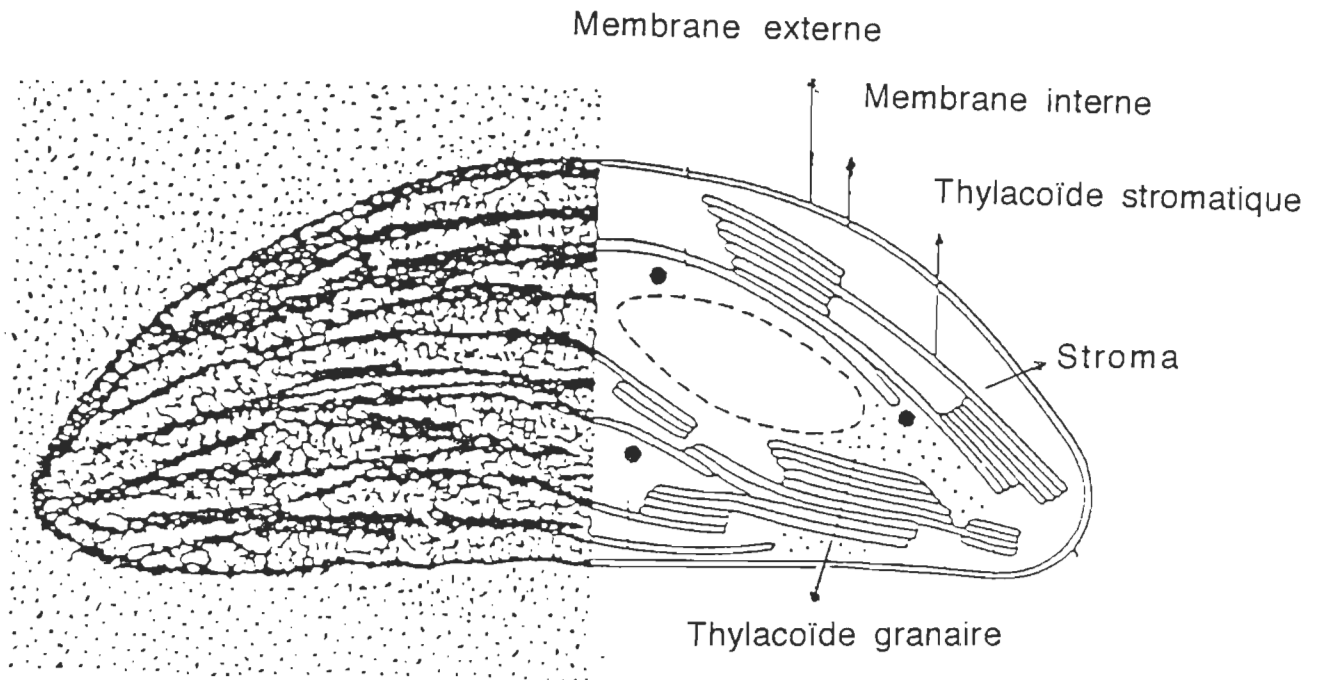


Figure 1.1 Structure du chloroplaste (Hader et Tevini, 1987)

Le stroma, c'est-à-dire la partie liquide du chloroplaste (Figure 1.1), contient les enzymes nécessaires à la fixation du CO_2 et à la synthèse des glucides, tandis que le grana est spécialisé dans les réactions photochimiques de la photosynthèse. C'est dans ce réseau complexe de membranes que se trouvent les composantes protéiques nécessaires à la phase lumineuse (absorption de la lumière, séparation de charges et transport d'électrons) de la photosynthèse.

Les thylacoïdes renferment cinq complexes membranaires: les complexes antennes du photosystème II (PSII), les centres réactionnels du PSI et du PSII, le complexe cytochrome b_6/f , le complexe de l'ATP synthétase ($\text{CF}_0\text{-CF}_1$) (Murphy, 1986).

Toutes les chlorophylles de la membrane thylacoïdienne, qui constituent environ 20 à 30% du total lipidique de la membrane, sont associées à des polypeptides spécifiques pour former des complexes pigment-protéine (Ortega et al, 1989). Les autres pigments des thylacoïdes sont les caroténoïdes, dont le rôle est la photoprotection de la chlorophylle et la collection de l'énergie lumineuse, et les xanthophylles (Murphy, 1986).

1.2. Absorption de l'énergie lumineuse et transport des électrons

Pour les plantes supérieures, la première étape de la photosynthèse est l'absorption de la lumière par les molécules de Chl a et des pigments accessoires (Chl b et caroténoïdes). Seules les

molécules de chlorophylle des centres réactionnels sont capables d'effectuer le processus de la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Il existe aussi plusieurs variétés de protéines-Chl capteuses de l'énergie lumineuse, notamment les complexes Chl-protéine interne et externe du PSII (Murata et al, 1984).

Au cours de la photosynthèse, les pigments de l'antenne chlorophyllienne (e.g., LHCII) absorbent un photon et canalisent son énergie vers le complexe P680 dans le centre réactionnel du PSII (Figure 1.2). Ce dernier transforme l'énergie du photon en énergie potentielle, et devient excité, $P680^*$. Il cède alors un électron à la Phéo pour former l'ion $P680^+$ (Ort, 1986); la Phéo porte alors une charge négative, et le P680 une charge positive (Figure 1.3). La séparation des charges augmente quand, successivement, la Phéo transmet son électron excédentaire à la plastoquinone Q_A , la tyrosine Z dans la protéine D1 (voir plus loin Figure 4.1 dans section 4.1.1) donne un électron à $P680^+$, et la plastoquinone Q_A transmet l'électron reçu à la quinone Q_B . Ces transferts de charges se font très rapidement: le transfert initial d'un électron entre le P680 activé et la Phéo dure moins de 10^{-12} secondes (Govindjee et Coleman, 1985).

Par étapes successives, les charges positives et négatives se séparent ainsi progressivement. Le transfert des électrons s'achève lorsque tous les composants du PSII redeviennent électriquement neutres.

Comment la quinone Q_B élimine-t-elle sa charge négative, et comment la tyrosine Z^+ récupère-t-elle l'électron qu'elle a perdu?

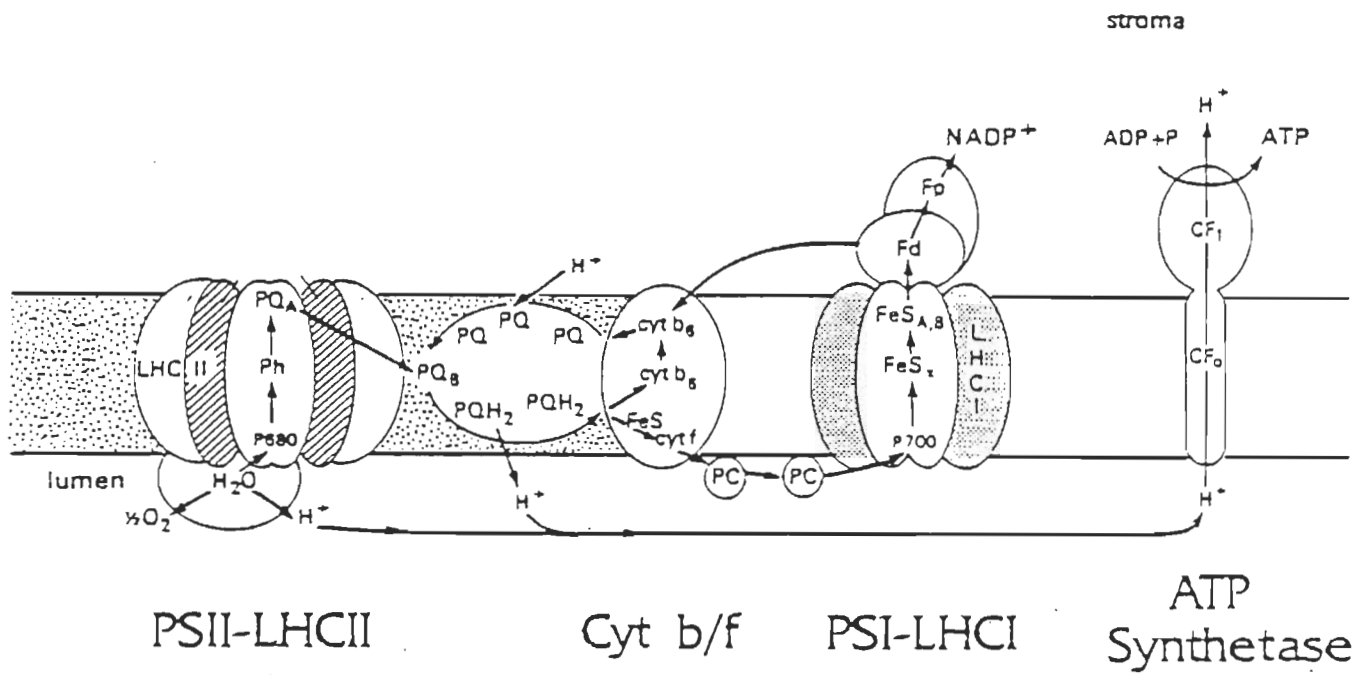


Figure 1.2 Structure imagée de la membrane des thylacoïdes.

(Webb et Green, 1991)

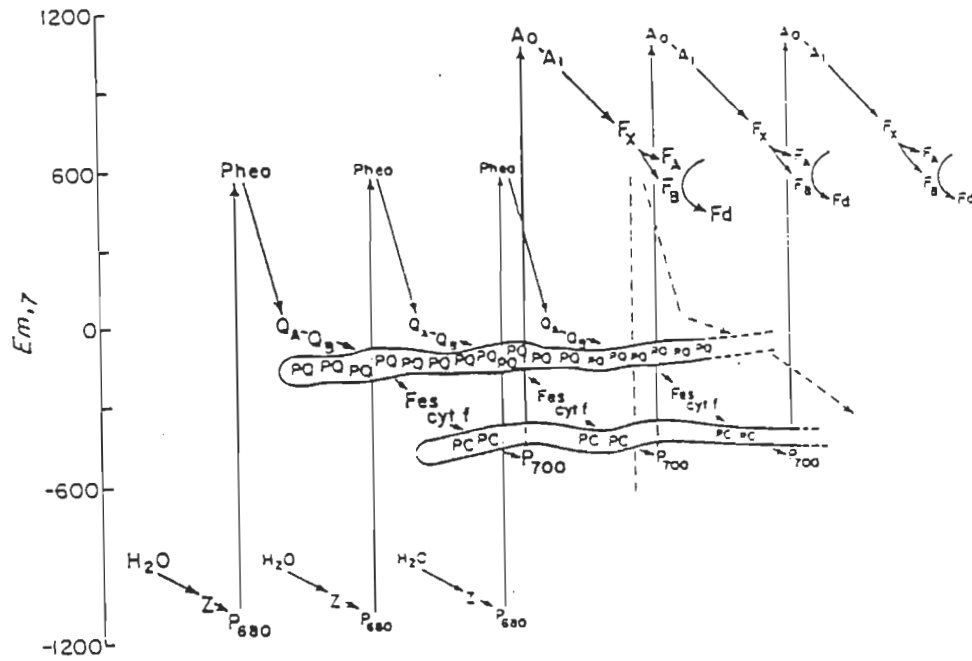


Figure 1.3. Transport d'électrons dans la membrane photosynthétique (Ort, 1986).

À la face externe de la membrane photosynthétique, la régénération de la quinone Q_B est simple: quand celle-ci a acquis deux électrons, elle capte deux protons et quitte le photosystème II (Govindjee et Coleman, 1985), remplacé par une quinone Q_B neutre. Les protons libérés sur la face interne de la membrane thylacoïdienne servent notamment à synthétiser l'adénosine triphosphate, une molécule qui emmagasine l'énergie indispensable au métabolisme du chloroplaste.

À la face interne de la membrane, la tyrosine se régénère beaucoup plus difficilement; elle doit prendre un électron à une substance oxydable présente dans l'environnement de la cellule comme l'eau (Govindjee et Coleman, 1990).

1.3. Composition lipidique de la membrane des thylacoïdes

La structure membranaire du thylacoïde contient une grande quantité de lipides. Les principales classes de lipides de cette membrane sont le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), le digalactosyldiacylglycérol (DGDG), le sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) et le phosphatidylglycérol (PG). Les lipides neutres, MGDG et DGDG, constituent au moins 67% de la totalité lipidique de la membrane des thylacoïdes (Tableau 1.1). Ces lipides (Figure 1.4) possèdent une tête hydrophile formée respectivement d'un et de deux groupements galactose attachés à un résidu de glycérol (Figure 1.4). À ce dernier

Tableau 1.1 Distribution, en pourcentage, des lipides dans la membrane des thylacoïdes.

Type de lipide ^d	Distribution en %		
	a	b	c
MGDG	54.1	56	38
DGDG	24.1	29	29
SQDG	9.6	3	14
PG	7.4	5	12
PC	4.8	7	5

(a) Siegenthaler et al, (1987).

(b) Murata et al, (1990).

(c) Murphy et Woodrow, (1983).

(d) MGDG, monogalactosyldiacylglycérol; DGDG, digalactosyldiacylglycérol; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycérol; PG, phosphatidylglycérol; PC, phosphatidylcholine.

sont liées deux chaînes d'acides gras estérifiés. Ensuite, vient le SQDG, principal lipide chargé, avec une proportion de 10% (Murata et al, 1990). La tête polaire de ce lipide est constituée d'un glycérol et d'un sucre possédant un groupement sulfonique au sixième carbone (Figure 1.4).

L'une des propriétés les plus affectées par le type de lipide est la fluidité membranaire. Certains lipides des thylacoïdes ont une grande tendance à adopter l'état fluide (Tableau 1.2). Dans ce contexte, les mesures de fluorescence du chloroplaste ont démontré que le degré d'insaturation du MGDG joue un rôle important dans l'organisation de la structure supramoléculaire du complexe de PSII (Siefermann et al, 1982).

Plusieurs études ont démontré que les lipides chargés sont essentiels à l'activité de plusieurs enzymes membranaires. Cependant, le rôle des lipides neutres est présentement un sujet de controverse quant à leurs éventuelles contributions à l'organisation et à l'activité membranaire des thylacoïdes.

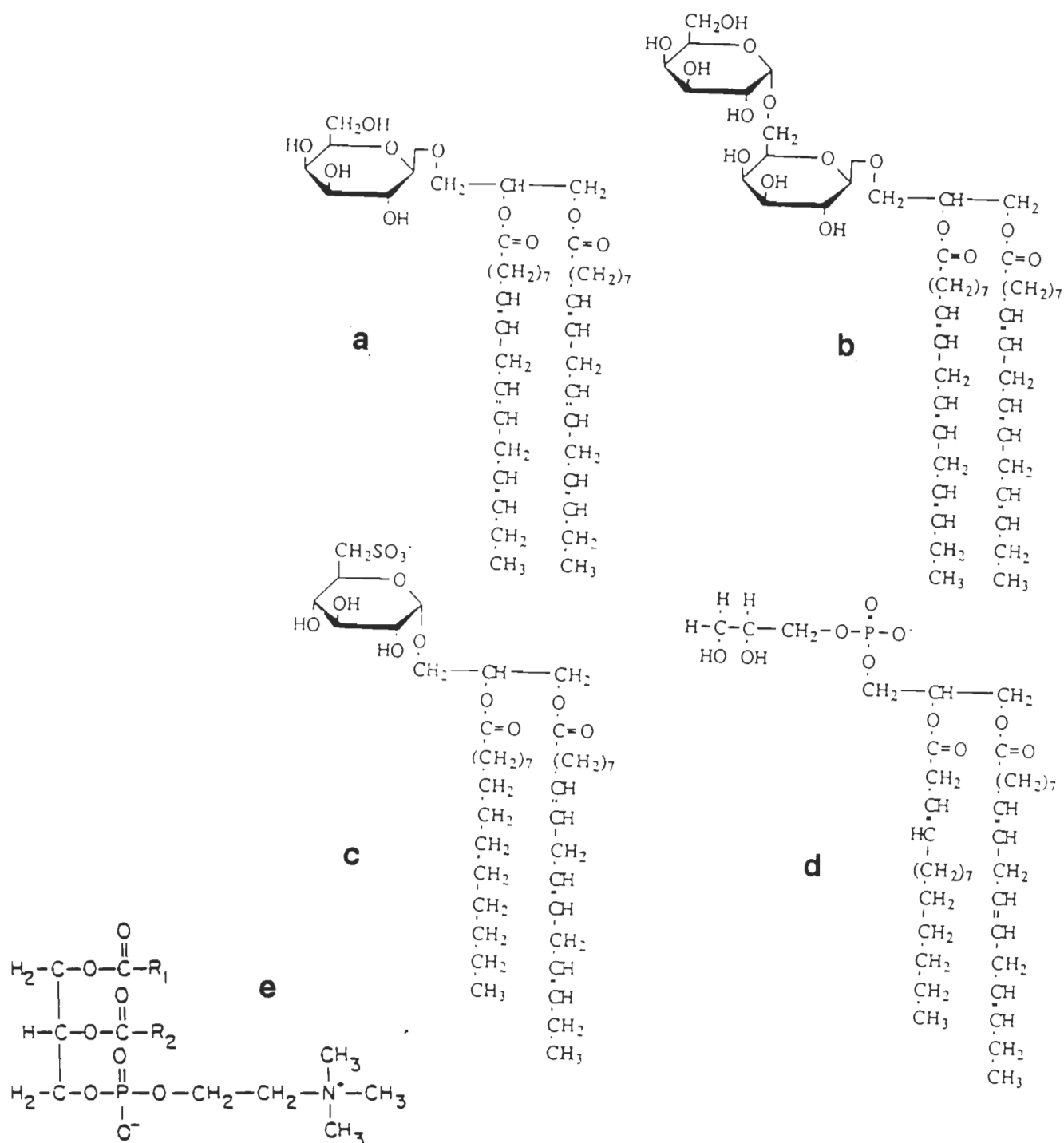


Figure 1.4 Structure chimique des principaux lipides de la membrane des thylacoïdes (a) MGDG; (b) DGDG; (c) SQDG; (d) PG; (e) PC

(Webb et Green, 1991; Ort, 1986)

Tableau 1.2 Composition, en pourcentage, des chaînes acyles^a des cinq principaux lipides de la membrane des thylacoïdes.

Chaîne acyle	Classe de lipide				
	MGDGB ^b	DGDGC ^c	SQDGD ^d	PG ^d	PC ^d
14:0	-	-	-	1	-
16:0	-	8.5	39	11	12
16:1tr	-	-	-	32	-
16:3	-	-	-	2	4
18:0	-	0.7	-	-	-
18:1	-	3.5	-	2	9
18:2	4.4	3.1	6	4	16
18:3	95	84	52	47	58

- (a) acide palmitique (16:0)
 acide hexadécénoïque trans (16:1tr)
 acide palmitique (16:3)
 acide stéarique (18:0)
 acide oléique (18:1)
 acide linoléique (18:2)
 acide linolénique (18:3)
- (b) Gallant, 1990
 (c) Menikh et Fragata, 1993
 (d) Allen et Good, 1971

1.4. Dispersion lipidique dans un milieu aqueux

La dispersion dans un milieu aqueux de certains lipides du chloroplaste conduit facilement à la formation de structures vésiculaires fermées appelées liposomes (Tableau 1.3). Le coeur hydrophobe de la membrane est responsable de l'imperméabilité relative, mais sélective, des liposomes aux ions et aux molécules hydrophiles.

Actuellement, les liposomes font l'objet d'un très grand nombre d'études, car ils constituent des membranes modèles très intéressants dans des études d'ordre fondamentale et pour la transmission des substances médicamenteuses (Shechter, 1990). Il existe deux principaux types de liposomes: les liposomes multilamellaires et les liposomes unilamellaires. Parmi ces derniers, il existe des liposomes de petite taille et des liposomes de grande taille. Un des principes importants qui régissent la formation de ces structures est celui des forces opposées (Tanford, 1980), selon lequel les parties polaires sont soumises à des forces répulsives, alors que les chaînes hydrophobes subissent une attraction de type van der Waals. Toutefois, la présence d'espèces ioniques dans la solution aqueuse entourant une couche bilipidique peut altérer les interactions entre les vésicules.

Il a été démontré (Lau et al, 1988; Cohen et Cohen, 1981) que les ions monovalents et divalents peuvent s'adsorber aux vésicules, ce qui modifie la température de transition de phase gel-cristal liquide et affecte la fluidité membranaire (Tscharner et Radda, 1981).

Tableau 1.3 Dispersion des lipides de la membrane des thylacoïdes dans un milieu aqueux.

Extrait lipidique	Méthode	Structure observée	Réf
DGDG	Dispersion	Vésicules	a
MGDG	Dispersion	Hexagonale inversée (H_{II})	a
MGDG:DGDG 50:50	Phase inverse	Vésicules	b
PG	Dispersion	Vésicules	a
PC	Dispersion	Vésicules	a

(a) Sprague et Staehelin, 1984

(b) Webb et Green, 1991

La seconde conséquence de la présence d'espèces ioniques est la réduction des forces répulsives entre les vésicules lipidiques suite à une perturbation de la structure organisée des molécules d'eau à l'interface DGDG-eau (Barber, 1980).

1.5. Empilement de la membrane des thylacoïdes

La composition lipidique de la membrane des thylacoïdes est unique dans le sens où la majeure partie des lipides de la membrane est constituée de galactolipides neutres, tels le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG). Plusieurs études favorisent le postulat de la contribution de ces lipides neutres dans l'activité et dans l'empilement de la membrane des thylacoïdes (Hooper, 1984; Carpentier et al, 1983; Sprague, 1987).

Selon Murakami et Packer (1970), la concentration des cations monovalents nécessaires à l'empilement des membranes thylacoïdiennes est plus importante que celle des cations divalents. Dans le même sens, l'analyse de la membrane des thylacoïdes du chloroplaste par neutrons activés (Nakatani et al, 1979) confirme les résultats de la simulation du potentiel de surface en présence de cations (Barber, 1980). Selon ces résultats, les charges de surface de la membrane doivent être neutralisées ou annulées afin que la structure empilée de la membrane soit préservée. De plus, des études par cryofracture

montrent que la distribution et l'orientation des particules de la membrane des thylacoïdes sont affectées par la concentration des cations (Staehelin, 1976)

1.6. Définition des objectifs

Malgré le nombre considérable de travaux concernant la participation des lipides des thylacoïdes dans l'adhésion réversible de la membrane des thylacoïdes et dans l'activité des systèmes photosynthétiques, leur rôle n'a pas encore été élucidé clairement (Webb et Green, 1991). Les mécanismes de l'intervention des lipides non ioniques sont peu connus, particulièrement en ce qui a trait à leur fonctionnement et à l'organisation du photosystème II (voir, par exemple, Gounaris et al, 1983; Butler et Matsuda, 1983).

Le présent projet se divise en trois parties:

A -Il ressort de la discussion précédente que les ions monovalents et divalents peuvent agir sur l'empilement de la membrane thylacoïdienne. Puisque ces ions sont présents dans les systèmes biologiques et peuvent interagir avec les lipides membranaires, nous nous proposons d'étudier cette question à l'aide d'un lipide non ionique, le DGDG. Nous analyserons les conditions de concentrations cationiques nécessaires pour provoquer la coagulation des dispersions aqueuses des vésicules du DGDG. Les cations utilisés (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) sont tous susceptibles d'être trouvés dans le stroma près de la membrane des thylacoïdes.

Les sites d'interaction les plus probables de ces cations avec la tête polaire du DGDG seront étudiés par spectroscopie infrarouge (ir) dans le but d'obtenir un modèle qui permettrait d'expliquer les mécanismes qui sont à l'origine de l'agrégation des vésicules lipidiques. L'analyse des résultats nous permettra de comparer le comportement des lipides neutres à celui des lipides chargés. Cette comparaison servira à étudier les forces mises en jeu lors du rapprochement des vésicules et à déterminer le rôle des cations.

B -Étudier la possibilité d'une fusion des vésicules du DGDG sous l'effet des cations sus-mentionnés. Ceci se fera par les deux techniques suivantes:

1 -L'étude par spectroscopie de fluorescence d'un mélange de deux populations de vésicules faites à partir de DGDG, qui contiennent deux sondes différentes ($TbCl_3$, acide dipicolinique), nous informera sur la possibilité d'une éventuelle fusion de ce type de vésicules lipidiques.

2 -La réversibilité de l'agrégation des vésicules du DGDG, qui contiennent un chélateur, l'acide tétraacétique d'éthylène diamine (EDTA), sera étudiée par la technique de turbidité.

C -Discerner le rôle fonctionnel du DGDG et les changements qu'il peut induire aux protéines du PSII. À cette fin, la méthode de la reconstitution membranaire sera utilisée avec des mélanges PSII/lipide (DGDG). Cette technique nous permettra de déterminer l'effet de la concentration de lipides sur l'activité du dégagement d'oxygène. La

spectroscopie infrarouge servira à étudier les interactions moléculaires qui se produisent lors de la reconstitution des systèmes membranaires.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Produits chimiques et méthodes de purification et d'analyse

2.1.1. Produits chimiques

Le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) a été obtenu de la compagnie Lipid Products (South Nutfield, UK) et purifié par la méthode de chromatographie liquide à haute pression (HPLC; voir Figure 2.1). Le pourcentage des chaînes grasses de ce lipide est déterminé par chromatographie en phase gazeuse (voir ci-dessous). Les produits qui sont utilisés pour analyser les chaînes grasses sont tous achetés à la compagnie Pierce Chemical Co (Rockford, IL). Les sels utilisés (CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl), achetés à la compagnie Sigma Chemicals Co (St-Louis, MO), sont purifiés selon la méthode décrite par Lessard et Fragata (1986). Le galactose est acheté à la compagnie Fisher Scientific Co (Fair Lawn, NJ). Les autres produits chimiques utilisés dans ce travail sont tous achetés à la compagnie Sigma Scientific Co.

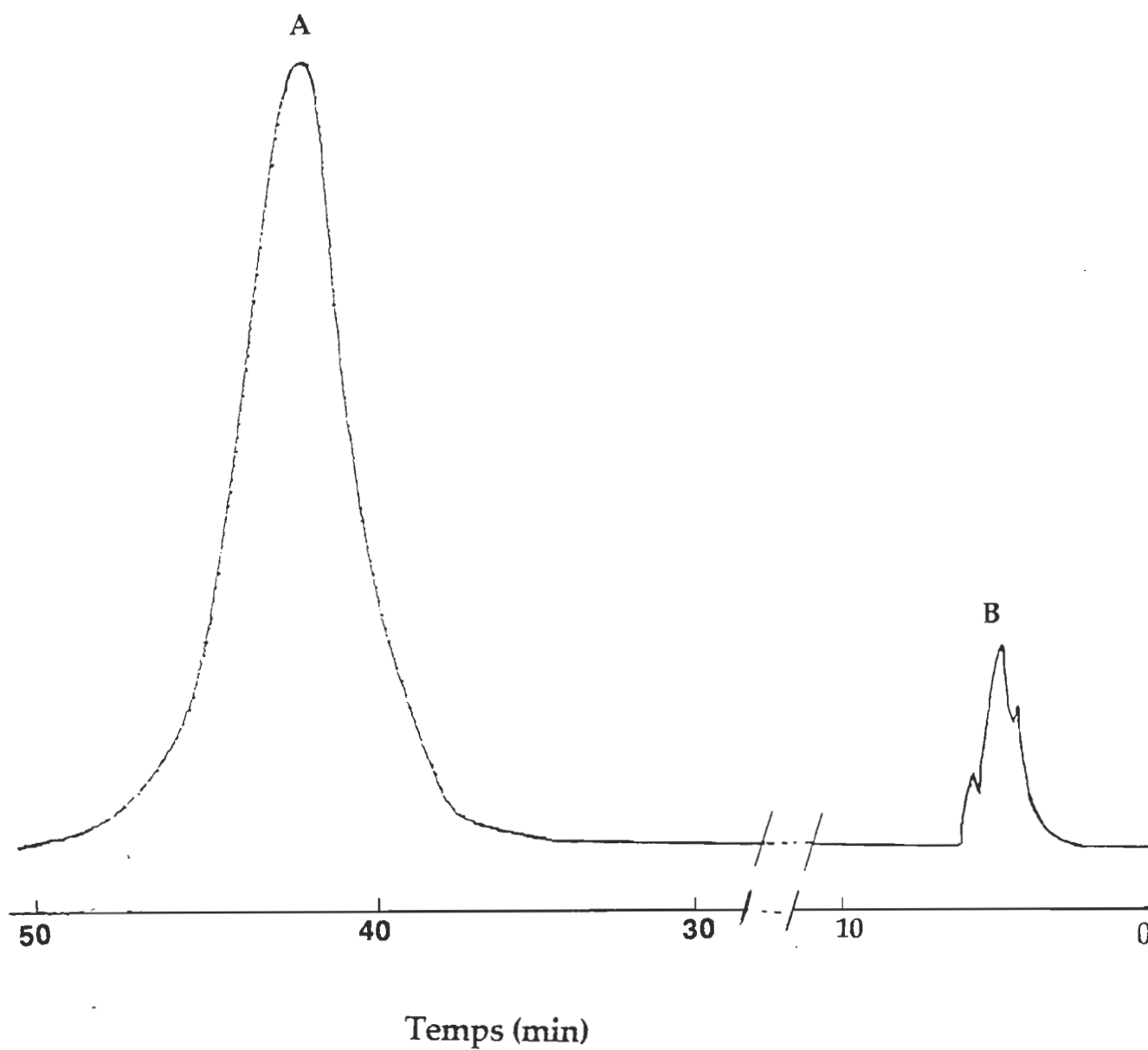


Figure 2.1 Chromatogramme de la purification du DGDG par HPLC. La phase mobile est constituée d'un mélange d'hexane, d'isopropanol et d'eau (70:30:2). A, DGDG. B, impuretés

2.1.2. Purification des sels et du DGDG

Le lipide utilisé au cours de nos expériences, le DGDG, a été purifié par la méthode HPLC (high pressure liquid chromatography), en utilisant un appareil constitué de deux pompes 510 réglées à un débit de 10 ml/min sous une pression de 2400 PSI. Ces deux pompes servent à propulser la phase mobile constituée d'un mélange de n-hexane:isopropanol:eau (70:30:2), préalablement filtré à travers une membrane avec des pores de 0.2 μm de diamètre puis dégazé sous vide. Le lipide étudié est injecté dans la colonne à des concentrations moyennes de 5 mg/ml.

Les séparations chromatographiques sont basées sur les différences des temps de rétention (Figure 2.1), des divers composants de l'échantillon dans une colonne de gel de silice poreux de 5 μm de diamètre. La détection se fait à l'aide d'un spectromètre d'absorption qui contient un détecteur dont la longueur d'onde est fixée à 205 nm. La pureté a été démontrée par la comparaison de nos résultats avec des études antérieures (Gallant, 1990).

Les sels MgCl_2 , CaCl_2 et NaCl ont été purifiés à l'aide de trois solvants: le méthanol, le benzène et le chloroforme. Ils sont ensuite séchés dans une étuve (100-130°C) pendant 48 heures afin d'évaporer les résidus de solvant (Lessard et Fragata, 1986).

2.1.3. Analyse chimique des chaînes acyles du DGDG

Dans le but d'analyser la composition en chaînes acyles du DGDG, nous avons effectué une méthylation. Dans ce procédé, on sèche une quantité approximative de 0.1 g de lipide dans une fiole sous une atmosphère d'azote à l'aide d'une plaque chauffante. On ajoute ensuite au lipide séché 1 ml de trifluorure de bore dans du méthanol ($\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 14% m/v). L'ensemble est chauffé à une température de 100° C pendant 20 minutes, puis le contenu est transféré dans une éprouvette dans laquelle sont ajoutés l'hexane et l'eau de rinçage du résidu de la fiole. La séparation des phases se fait par plusieurs inversions de l'éprouvette, fermée hermétiquement, pendant quelques minutes. La phase supérieure, qui constitue la phase organique, est transférée dans une autre éprouvette puis séchée par l'ajout de 0.3 g de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) préalablement séché à 100° C pendant une nuit. La phase organique séchée est évaporée à sec par un jet d'azote. Les chaînes d'acides gras du lipide méthylé sont solubilisées dans 40 μl d'hexane distillé avant l'injection.

Les constituants du mélange à séparer se partagent différemment entre deux phases: l'une est immobile, tandis que l'autre phase, mobile, percole à travers la phase fixe. Le gaz vecteur est généralement l'hélium bien que l'argon, l'azote et le gaz carbonique sont parfois utilisés. On utilise presque toujours la méthode de l'élution qui consiste à injecter dans le courant de la phase mobile, plus précisément en amont de la colonne, pendant un temps aussi bref que possible, un mélange de 5 μl des chaînes grasses à étudier. L'identification de chaque groupe de méthyl-ester est faite

en comparant son temps de rétention avec celui d'un standard connu PUFA de la compagnie Superlco Canada Ltée (Oak ville, ON).

La composition en chaîne acyle de DGDG en mole (%) est 16:0 (8.5), 18:0 (0.7), 18:1 (3.5), 18:2 (3.1), et 18:3 (84). Tout au long de ce travail, nous utiliserons des galactolipides avec cette composition afin d'éviter l'effet de changements de chaînes d'acides gras sur l'activité photosynthétique (Huner et al, 1987).

2.2 Méthodes préparatives

2.2.1. Préparation des vésicules de DGDG

2.2.1.a. Méthode préparative pour des études d'agrégation

Les vésicules lipidiques unilamellaires sont principalement utilisées comme modèles membranaires. Leur capacité à piéger les solutés dans la phase aqueuse interne en fait de bons modèles. De nombreuses techniques ont été proposées pour préparer les vésicules à partir de composés amphiphiles. La préparation des vésicules unilamellaires par sonication est la technique la plus utilisée. La technique de Huang (1969) modifiée par L'Heureux et Fragata (1987) permet d'obtenir des vésicules unilamellaires homogènes en dimension.

Les vésicules unilamellaires sont obtenues à partir d'un extrait lipidique de digalactosyldiacylglycérol. Pour ce faire, 5 mg de lipide séché sous un jet d'azote est dispersé dans 1 ml de D₂O. Après

agitation, il se forme des vésicules multilamellaires séparées les unes des autres par des couches d'eau lourde. La sonication de vésicules dans un appareil Heat-Systems Ultrasonics, modèle W-225R (Plainview, LI) réglé à 160 W à la sortie, pendant 15 minutes dans une cellule réfrigérée avec de l'azote barbotant dans la solution, permet d'obtenir des vésicules unilamellaires non oxydées.

2.2.1.b. Méthode préparative pour des études de fusion

Dans le cas de l'étude de la fusion, les vésicules unilamellaires sont obtenues par la suspension de lipide à une concentration finale de 10 μ M dans 2 ml des deux solutions suivantes: (i) 10 mM TbCl_3 , 100 mM citrate de sodium et le tampon 2 mM L-histidine, 2 mM N-tris [Hydroxyméthyl] méthyle-2-aminoéthane acide sulfonique (Tes), (ii) 100 mM acide dipicolinique et le tampon précédent. Les pH de ces solutions sont ajustés à 7.4. Après une agitation de 10 minutes, les deux préparations sont soumises à une sonication d'une heure, puis à une centrifugation à 11500 rpm pour enlever les grosses vésicules et/ou les agrégats.

Les vésicules unilamellaires obtenues sont séparées du matériel non encapsulé par filtration sur une colonne de gel Séphadex G-75 (Pharmacia) suivant la méthode décrite par Wilschut et al (1981). Le tampon d'élution (2 mM histidine, 2 mM Tes) contient 0.05 mM EDTA. Notons que L'EDTA est utilisé uniquement dans le but de dissocier le complexe Tb/DPA à l'extérieur des vésicules.

2.2.2. Extraction du PSII et reconstitution membranaire

La méthode d'extraction de la membrane du PSII à partir de plante d'orge est tirée des travaux de Berthold (Berthold et al, 1981). Environ 100 mg de feuilles d'orge sont mélangés avec 250 ml de tampon A (voir page 25) dans un malaxeur. Le tout est complètement broyé avant d'être versé dans un filtre à coton de fromage. Après filtration, la suspension de chloroplastes est centrifugée à 4° C à 6500 rpm pendant 90 secondes pour se débarrasser du surnageant vu que celui-ci contient des enzymes qui peuvent dégrader le PSII. Par la suite, 1 ml de la solution B (voir page 25) est mis dans chaque tube et l'ensemble est bien mélangé, pour ensuite faire une centrifugation à 3000 rpm pendant 5 minutes. À la fin de cette étape, le surnageant est enlevé délicatement et on ajoute au culot 15 ml de la solution C (voir page 25). Après homogénéisation de la solution obtenue, la concentration en chlorophylle est amenée à 2 mg/ml avec le tampon C et à 1 mg/ml avec le tampon D (voir page 25). Cette dernière dilution se fait goutte à goutte pendant 15 minutes. Après cette étape le tout est incubé pendant 20 minutes et ensuite centrifugé à 6000 rpm pendant 3 minutes. Le surnageant de cette centrifugation est centrifugé à 15500 rpm pendant 35 minutes. Le culot obtenu est suspendu dans environ 2 ml de la solution E (voir page 25). Ces membranes du PSII sont conservées à -125°C pour utilisation ultérieure.

Les techniques de reconstitution membranaire sont nombreuses, chacune présentant des avantages et des inconvénients. La technique la plus douce pour obtenir des vésicules lipidiques artificielles

Tampons utilisés pour l'extraction des particules du PSII

(Berthold et al, 1981; Nénonéné et Fragata, 1990)

Solution A (pH 6.7)

(milieu d'homogénéisation)

0.33 M sorbitol

10 mM pyrophosphate tétrasodium

5 mM MgCl₂

2 mM L-isoascorbate

Solution B (pH 7.6)

(suspension de chloroplastes)

50 mM Hepes

1 mM MgCl₂

2 mM EDTA

10 mM NaCl

Solution C (pH 6.5)

(suspension de grana)

0.4 M sucrose

20 mM Mes

15 mM NaCl

5 mM MgCl₂

Solution D (pH 6.7)

(suspension de chloroplastes)

0.4 M sucrose

15 mM NaCl

5 mM MgCl₂

20 mM Mes

12.5 ml Triton X-100

Solution E (pH 6.5)

(milieu de conservation)

éthylène glycol 30%, v:v

0.4 M sucrose

10 mM NaCl

40 mM Mes

incorporant la protéine est celle qui fait appel à des vésicules lipidiques préformées. Dans ce travail, nous nous proposons de reconstituer le complexe PSII-DGDG. Pour ce faire, des vésicules du DGDG sont préformées, soit par dispersion de différentes quantités de lipide dans un tampon de 20 mM Mes, 0.4 M sucrose, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 à pH 6.5, soit par dispersion de 5 mg de lipide dans 1 ml de D_2O . Les particules membranaires de PSII (0.03 mg de Chl par ml) sont mélangées et incubées, pendant 15 minutes à l'obscurité et à une température de 0°C pour reconstituer le complexe PSII-DGDG.

L'activité photosynthétique des particules du PSII incorporées aux vésicules préformées dans le tampon indiqué plus haut est étudiée en mesurant l'activité de dégagement d'oxygène. Par contre, les particules préparées dans le D_2O sont utilisées pour étudier les modifications structurales qui se produisent lors de l'interaction lipide-protéines. Le D_2O est utilisé car ses bandes d'absorption infrarouges chevauchent à peine celles des particules de PSII et des galactolipides.

2.3. Techniques de mesure

2.3.1. Méthodes spectroscopiques

2.3.1.a. Spectroscopie de fluorescence

Idéalement, une fusion implique la coalescence de deux membranes sans rupture de la barrière de perméabilité. Parmi les différentes techniques qui permettent de suivre cette coalescence,

nous mentionnons celles qui font appel au transfert interne d'énergie par résonance entre deux sondes fluorescentes (Ohki, 1982) dont nous présentons le principe à la Figure 2.2.

Lorsque une sonde donneuse (DPA, voir page 34) absorbe un photon, son niveau d'énergie est plus élevé, elle se trouve dans un état instable. Les états excités se désactivent par deux processus principaux: d'une part, la perte de l'énergie dans le milieu sous forme de chaleur, c'est la transition non radiative et, d'autre part, l'émission d'un quantum électromagnétique, c'est le phénomène de luminescence. Quand ce dernier provient de l'état singulet, c'est la fluorescence, mais s'il s'agit de la désactivation de l'état triplet, c'est la phosphorescence. À l'état triplet la sonde donneur peut transférer son énergie à une sonde accepteur (Figure 2.2). En recevant l'énergie de l'état triplet du DPA, le Tb^{3+} se trouve dans un état de résonance S_1 qui revient par la suite à l'état fondamental S_0 en émettant un photon (Mataga, 1970; voir, par exemple, Figure 2.2). Plus spécifiquement, l'interaction du Tb^{3+} avec le DPA (voir page 34) donne lieu à une molécule constituée de deux parties, l'une absorbante et l'autre fluorescente. Le transfert d'énergie du DPA au Tb^{3+} s'accompagne de l'augmentation de la fluorescence de l'accepteur, c'est-à-dire le Tb^{3+} . C'est cette propriété qui est mise à profit pour suivre la fusion de deux membranes.

Les mesures de fluorescence ont été effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluorolog 2 de SPEX, modèle 1870, (Spex Industries Inc., Metuchen, NJ), dont la source d'excitation est une lampe à arc au Xénon alimentée par une source ELXE-500. Une fente

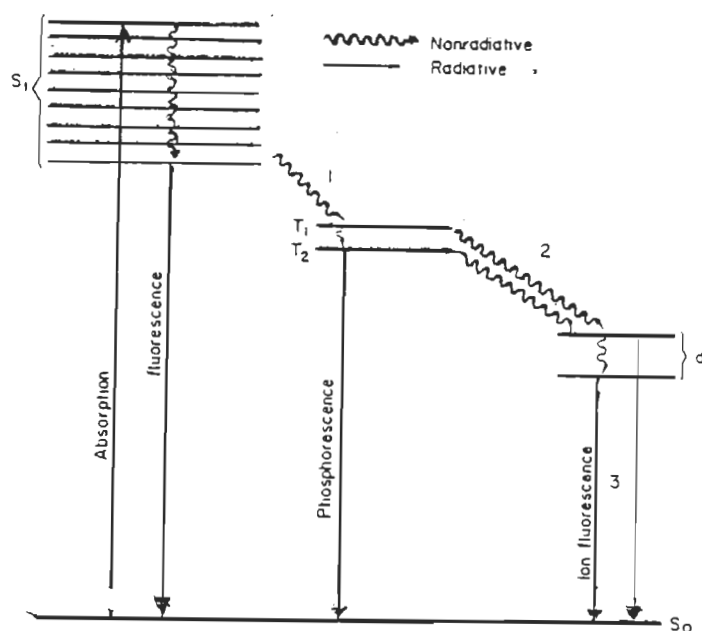


Figure 2.2 Diagramme d'énergie d'une molécule et mécanismes possibles de la dissipation de l'énergie d'excitation (Schulman, 1985).

ajustable règle l'intensité de cette lumière incidente. La radiation est ensuite dirigée vers un monochromateur (Modèle 1681, Minimate-2) qui sélectionne les longueurs d'onde d'excitation. Le monochromateur est contrôlé par un ordinateur (Spex Datamate). Une seconde fente à la sortie du monochromateur permet la résolution du faisceau incident sur l'échantillon. Une troisième fente ajuste l'intensité de la fluorescence. Un second monochromateur du même modèle, détermine les longueurs d'onde de la lumière émise qui seront détectées. Il est également contrôlé par ordinateur. Une dernière fente à la sortie du monochromateur permet la résolution du faisceau fluorescent au niveau du photomultiplificateur qui détecte la fluorescence (Products for Research Inc., Modèle R 928/115, Davers, Ma). Le photomultiplicateur est refroidi par un courant d'eau froide. L'ordinateur enregistre les signaux du photomultiplicateur. De plus, il est relié à une table traçante pour l'impression des spectres. Les deux fentes à l'excitation sont fixées à 4 mm alors que celles de l'émission sont ajustées à 1.5 mm. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 272 nm alors que les spectres d'émission sont enregistrés entre 400 et 600 nm. Les mesures sont prises à tous les deux nanomètres.

2.3.1.b. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

Les radiations infrarouges constituent la partie du spectre électromagnétique dont les longueurs d'ondes sont supérieures à celles du spectre visible et inférieures à celles des ondes radio ultracourtes. Les molécules absorbent l'énergie de ces radiations en modifiant leur énergie de vibration. Nous considérons ici deux types de vibrations moléculaire: les vibrations d'élongation et les vibrations de déformation. La première est une vibration au cours de laquelle deux atomes se rapprochent et s'éloignent périodiquement. Dans la seconde ce sont les angles entre les liaisons qui sont modifiés. Parmi ces vibrations, celles qui sont observées en infrarouge sont seulement celles qui entraînent des variations périodiques du moment dipolaire de la molécule. Ce sont en effet les perturbations survenant dans la molécule par les diverses vibrations qui sont responsables de l'interaction se produisant entre cette molécule et le champ électromagnétique oscillant de la radiation infrarouge.

Le principe de l'appareil utilisé dans ce travail est illustré sur la Figure 2.3. Dans un interféromètre de Michelson un miroir diviseur dirige la moitié du faisceau provenant de la source sur un miroir fixe M_1 et l'autre sur un miroir mobile M_2 . Ces deux faisceaux sont ensuite recombinaés pour donner un faisceau dont le domaine de fréquence dépend de la position du miroir mobile.

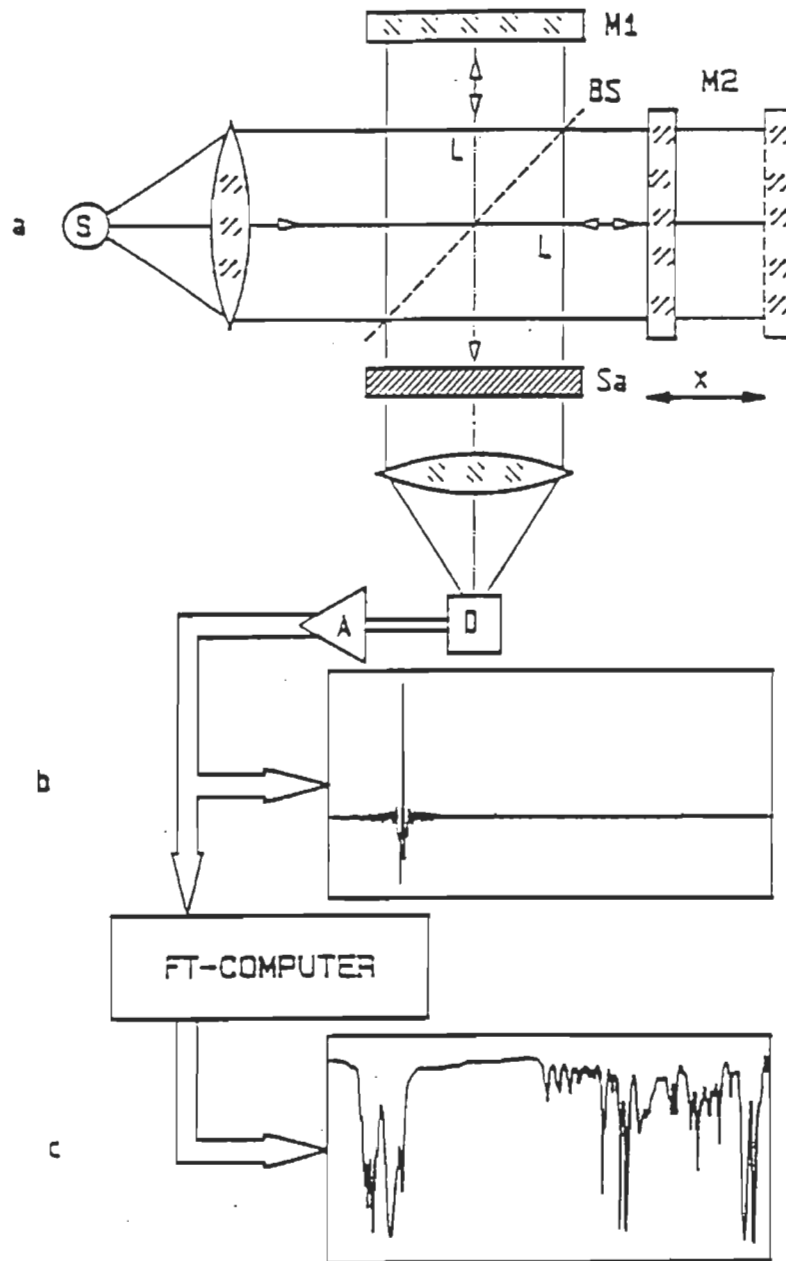


Figure 2.3 (a) Interféromètre de Michelson utilisé dans un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier; (b) Interférogramme détecté; (c) Spectre obtenu après traitement de l'interferogramme par transformée de Fourier; (A) Amplificateur; (BS) Séparateur de faisceau; (D) Détecteur; (L) Distance parcourue par le faisceau réfléchi; (M) Miroir mobile; (M1) Miroir fixe; (Sa) Porte échantillon; (S) Source de radiation; (x) Déplacement du miroir mobile; (Pacher et al, 1988).

Si le faisceau incident est à large bande de fréquence, le déphasage sera progressif en fonction de la longueur d'onde et l'intensité du faisceau subira un amortissement exponentiel. L'opération mathématique appelée transformée de Fourier permet de transformer une fonction exponentielle décroissante en une fonction Lorentzienne ou Voigt, elle-même étant une fonction caractéristique d'un pic d'absorption d'énergie. L'analyse mathématique par ordinateur des multiples exponentielles caractérisant l'atténuation après traversée d'une espèce absorbante, permet de reconstituer le spectre en fonction de la fréquence.

L'étude que nous avons menée est faite à l'aide d'un spectromètre Bomem DA3.02 équipé d'un détecteur HgCdTe et d'un séparateur de faisceau KBr couvrant la région de 500 à 5000 cm^{-1} . Les échantillons utilisés dans cette étude sont obtenus, d'une part, par la préparation des films minces, en déposant quelques gouttes d'échantillons sur les fenêtres de BaF_2 et à les laisser sécher pendant 24 heures. D'autre part par le lavage des membranes reconstituées de PSII ou du complexe PSII-DGDG avec l'eau deutérée, afin d'éliminer l'eau (H_2O) des préparations, en raison de ses larges bandes dans les régions étudiées. Le culot final est dilué dans le D_2O avec la concentration du sel désiré, puis il est comprimé entre deux fenêtres de BaF_2 , dont la référence a été préalablement enregistrée. Nous devons ajouter que dans ce dernier cas le spectre d'absorption intrinsèque du D_2O a été soustrait de tous les spectres de nos échantillons par une méthode itérative en utilisant le programme Spectra Calc (Galactic Industries Corporation, Salem, NH). Un spectre est considéré corrigé

lorsque la ligne de base entre 2100-1730 cm^{-1} devient aplatie (Dousseau et Pézolet, 1990).

Les spectres d'absorption sont obtenus par la collection et l'addition de 100 interférogrammes qui sont transformés en spectres avec une résolution de 2 cm^{-1} . Ils sont ensuite traités par le programme Spectra Calc, soit pour obtenir la dérivée seconde des spectres, soit pour quantifier les différences dans la région de l'amide I selon la méthode décrite dans la section 4.3. La calibration des fréquences est faite par la compagnie BOMEM à chaque fois que l'appareil est vérifié. Pour ce faire on utilise un film de polystyrène dont on connaît la position de chaque pic. La calibration de la phase est faite chaque semaine. Dans une première étape on fait la calibration avec le compartiment de l'échantillon vide. Dans une deuxième étape on fait la calibration avec le support de l'échantillon. Ces données sont enregistrées dans l'ordinateur de l'appareil et soustraites automatiquement à chaque mesure d'absorbance ou de transmittance.

2.3.1.c. Turbidimétrie

La mesure de la turbidité du milieu se fait par le passage d'un faisceau lumineux d'intensité I_0 à travers la solution dans laquelle sont dispersées les vésicules lipidiques pour donner une intensité I (Day et al, 1980). Ce phénomène est basé sur la théorie de Rayleigh-Gauss-Debye, qui relie la dispersion de la lumière aux dimensions des particules selon la relation:

$$I = I_0 \exp(-Bd)$$

où

d: représente le parcours optique

B: la densité optique, laquelle est donnée par:

$$B = \frac{8\pi^3(\epsilon_l - \epsilon_w)^2}{3\lambda^4 \epsilon_w^2} NV^2$$

ϵ_l, ϵ_w : Indices de réfraction du lipide et de l'eau, respectivement.

λ : Longueur d'onde de la lumière incidente

N: Nombre de particules par unité de volume

V: Volume de la particule dispersante.

Dans tous ce travail l'absorbance a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre modèle DW-2000 de la compagnie SLM-AMINCO (Urbana, ILL) en mode longueur d'onde avec une resolution de 3 nm.

2.3.2. Mesures de la fusion et de l'agrégation membranaire

2.3.2.a. Fusion

La fusion membranaire a été suivie à l'aide d'une technique qui consiste à encapsuler l'acide dipicolinique (DPA) dans une population de vésicules et le chlorure de terbium ($TbCl_3$) dans une autre population (Figure 2.4). Afin de comprendre la technique de mesure,

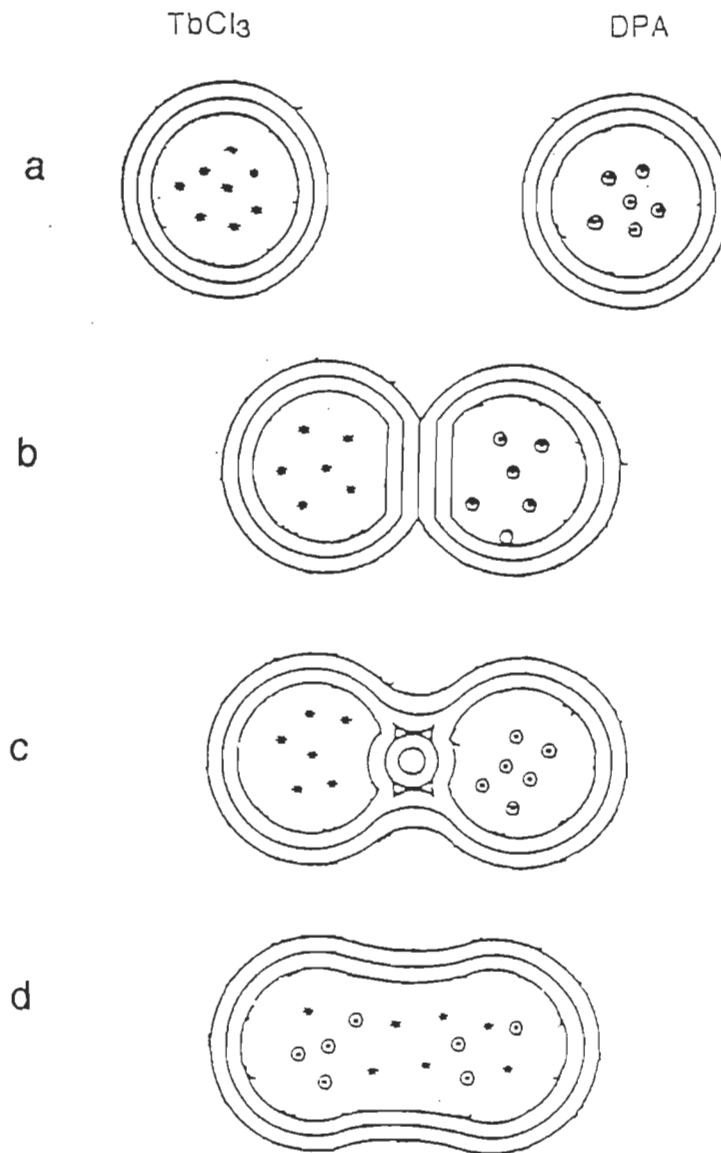


Figure 2.4 Les différentes étapes possibles dans la fusion membranaire.

(a) vésicules séparées dans une suspension aqueuse; (b) vésicules agrégées; (c) étape intermédiaire avant fusion; (d) fusion complète.

(Kozlov et al, 1989)

nous avons jugé utile de commencer par une étude des spectres d'absorption et de fluorescence de TbCl_3 et de DPA puis du complexe Tb/DPA. La Figure 2.5 montre le spectre d'absorption du TbCl_3 ($4 \mu\text{M}$) dans un tampon composé de 0.2 M NaCl, 2 mM L-Histidine et 2 mM Tes (pH 7.4). Nous observons que le TbCl_3 n'absorbe que très peu à la longueur d'onde 272 nm. Par ailleurs, le spectre d'absorption de DPA ($40 \mu\text{M}$) dans une solution de 0.2 M NaCl, 2 mM L-histidine et 2 mM Tes (pH 7.4) montre bien la forte absorption du DPA à la longueur d'onde de la lumière monochromatique envisagée (Figure 2.6). La chélation du TbCl_3 ($4 \mu\text{M}$) avec le DPA ($40 \mu\text{M}$) dans une solution de 0.2 M NaCl, 2 mM L-histidine et 2 mM Tes (pH 7.4) donne un complexe absorbant à la longueur d'onde d'excitation 272 nm (Figure 2.7). D'autre part, les spectres de fluorescence de 2 ml de chacune des solutions suivantes: (A): 10 mM TbCl_3 , 2 mM Tes, 100 mM acide citrique, 2 mM L-histidine 0.2 mM NaCl, et (B): 100 mM DPA, 2 mM Tes, prises séparément puis, dans un mélange 1:1 (v:v), sont représentés à la Figure 2.8. Nous observons que la fluorescence de DPA est très faible à la longueur d'onde 492 nm, alors que sa complexation avec le Tb^{+3} est accompagnée d'une importante augmentation de fluorescence, c'est-à-dire cent fois supérieure à celle de Tb^{+3} seul (voir section 2.3.1.a).

Dans ce travail, on encapsule l'acide dipicolinique dans une population de vésicules du DGDG et le chlorure de terbium (TbCl_3) dans une autre population (voir section 2.2.1.b). Le mélange 1:1 des deux populations précédentes dans 2 ml d'une solution de NaCl (0.2 M) dans une cuvette en quartz, dans laquelle est ajoutée la quantité désirée de sel, est excité à 272 nm alors que l'émission de

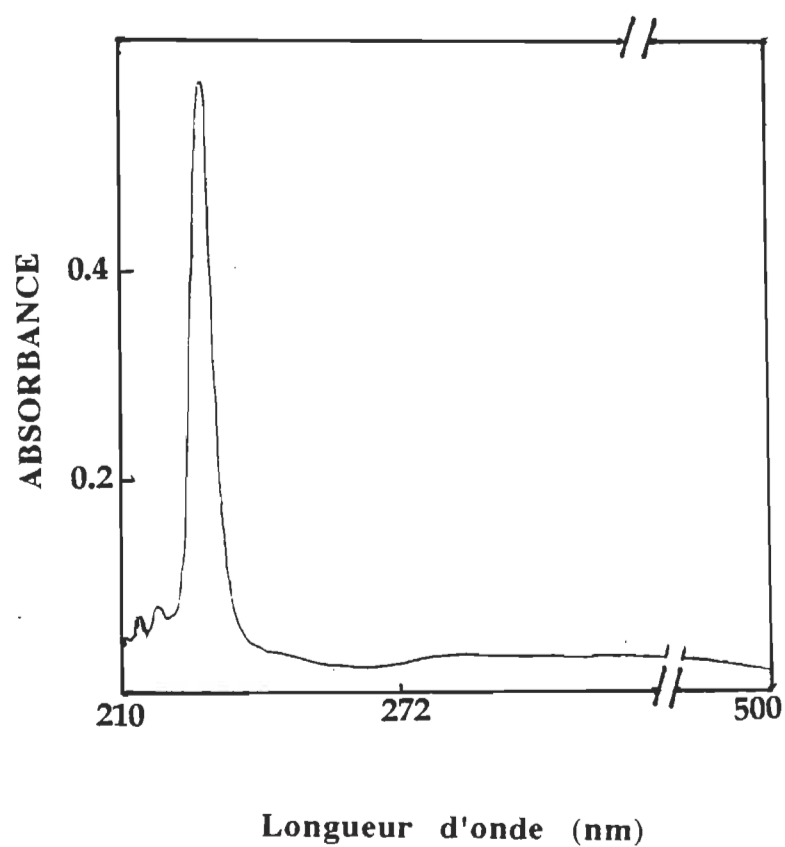


Figure 2.5 Spectre d'absorption du TbCl_3 ($4\mu\text{M}$) dans une solution de 0.2 M NaCl , 2 mM L-histidine et 2 mM Tes

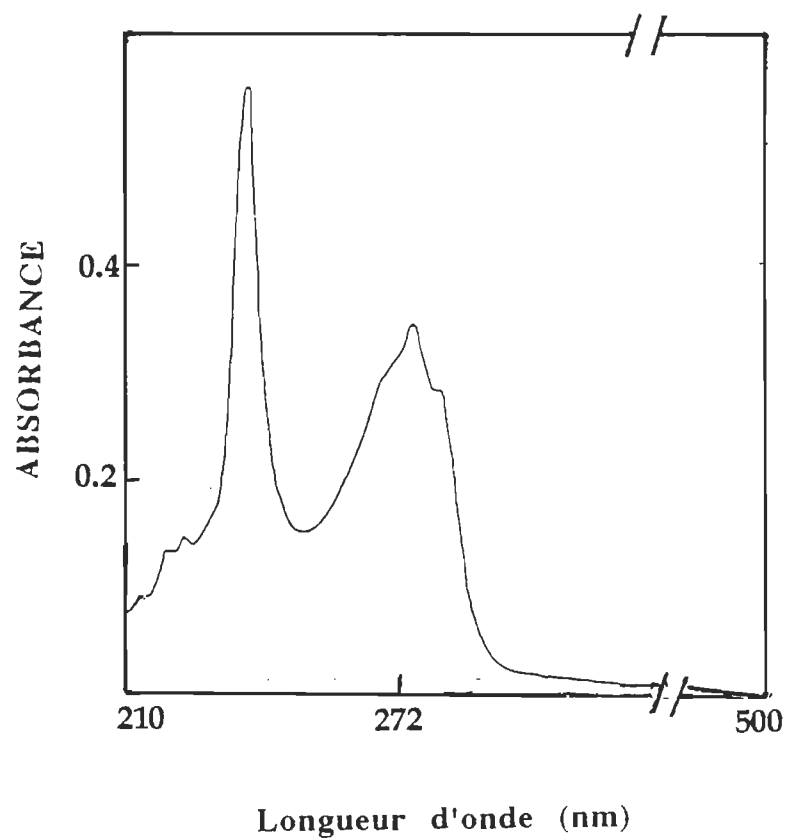


Figure 2.6 Spectre d'absorption du DPA (40 μ M) dans une solution de 0.2 M NaCl, 2 mM L-histidine et 2 mM Tes.

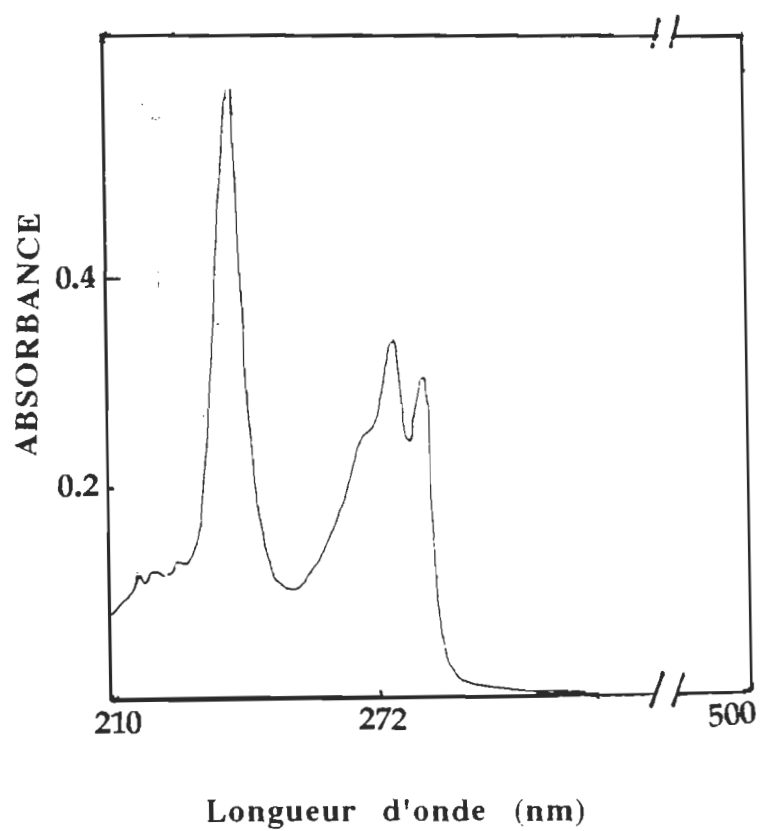


Figure 2.7 Spectre d'absorption d'un mélange de $4 \mu\text{M}$ TbCl_3 et $40 \mu\text{M}$ DPA dans une solution de 0.2 M NaCl , 2 mM L-histidine et 2 mM Tes.

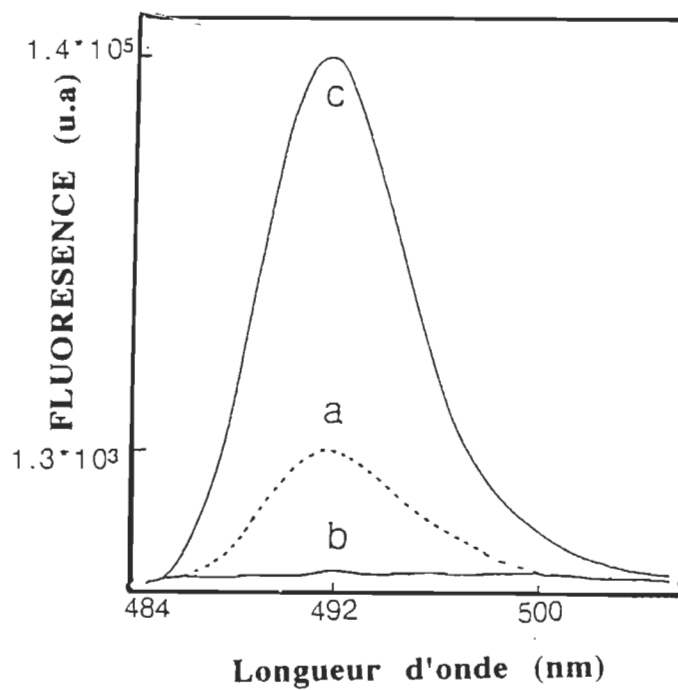


Figure 2.8 Spectres de fluorescence de 2 ml de: (a) 10 mM TbCl_3 , 2 mM Tes, 100 mM acide citrique, 2 mM L-histidine, 0.2 mM NaCl, (b) 100 mM DPA, 2 mM Tes, (c) mélange 1:1 des deux solutions précédentes.

fluorescence est enregistré à 492 nm. La valeur de 100% de fluorescence a été obtenue par la dispersion de lipide à une concentration finale de 10 μ M dans 2 ml des deux solutions notées (i) et (ii) de la section (2.2.1.b). Les autres pourcentages ont été calculés par la règle de trois en mélangeant les deux populations des vésicules du DGDG selon la méthode décrite plus haut.

2.3.2.b Agrégation et réversibilité d'agrégation

L'agrégation des vésicules lipidiques dans un milieu aqueux a été mesurée par turbidimétrie en utilisant un spectrophotomètre modèle DW-2000 de la compagnie SLM-AMINCO (Urbana, ILL), en utilisant les deux monochromateurs, dont un comme référence. La résolution étant fixée à 3 nm et les courbes sont directement reproduites à l'aide d'une traçeuse Hewlett-Packard modèle 7470A. La variation de la turbidité des vésicules lipidiques sous l'effet des cations monovalents et divalents nous renseigne sur le degré d'agrégation des vésicules lipidiques. La valeur maximale de la turbidité a été considérée comme étant le 100%. Les autres pourcentages ont été calculés par la règle de trois à partir des valeurs mesurées de la turbidité en fonction des sels.

La réversibilité de l'agrégation des vésicules de DGDG, préalablement coagulées sous l'effet des cations divalents, est obtenue en mesurant d'abord la turbidité à 600 nm par l'addition de 8 μ M de CaCl_2 (1M) ou de MgCl_2 (1M) à 1 ml de la suspension aqueuse. Lorsque le maximum de turbidité des vésicules du DGDG est atteint

sous l'effet des cations divalents, la quantité désirée du chélateur EDTA (1M) est ajoutée, et la décroissance de la turbidité est mesurée.

2.3.3. Mesure de dégagement d'oxygène par polarographie

L'appareil utilisé pour mesurer le dégagement d'oxygène provenant de l'illumination du complexe du photosystème II (PSII) est constitué d'une électrode d'argent et d'une cathode de platine (Hansatech D.W. Oxygen Electrode Unit, King's Lynn, Norfolk, England) recouvertes d'une membrane en téflon qui les séparent du milieu réactionnel. Lorsque la différence de potentiel aux bornes des électrodes est entre -0.6 V et -0.9 V, il se forme à la surface de l'électrode de platine du peroxyde d'hydrogène provenant de l'oxygène réduit. Ceci donne naissance à un courant proportionnel à la quantité d'oxygène produite par le matériel photosynthétique et consommée à la cathode.

Dans le but d'étudier l'effet du DGDG sur l'activité photosynthétique du PSII, nous avons incorporé les particules de PSII dans des vésicules préformées de DGDG à différentes concentrations. L'activité en oxygène de la membrane reconstituée est mesurée par la mise en mélange, dans la cellule de l'appareil, de 780 μ l de la solution C (voir page 25), (0.4 M sucrose, 20 mM Mes, 15 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 6.5), 10 μ l du complexe PSII (0.03 mg de Chl par ml) ou PSII-DGDG et 10 μ l de l'accepteur d'électron DCBQ (350 μ M). L'ensemble est bien mélangé à l'aide d'une barre magnétique pendant deux minutes dans l'obscurité, et à une température constante de 20°C. Ensuite, la

suspension est éclairée par une lumière blanche d'intensité saturante (240 mW/cm²) pendant 90 secondes. L'oxygène formé lors de la photolyse de l'eau peut être calculer par la formule.

$$O_2 \text{ (dégagé)} = \frac{0.276 \cdot x \cdot 60}{y \cdot \text{Chl}} (\mu\text{mol } O_2 / \text{mg Chl} / \text{h})$$

où x: la pente de courbe de dégagement d'oxygène.

y: la cordonnée normale de la courbe d'absorption d'oxygène, par le sodium hydrosulfite dans 1 ml d'eau, en fonction du temps.

La concentration de la Chl a été déterminée, par la mesure de la densité optique d'un mélange de 5 ml d'acétone (80%) et de 12.5 µl du PSII, selon la formule suivante

Concentration de Chl (mg/ml)=[(8.02 (densité optique à 663 nm)+20.2 (densité optique à 645 nm)] 0.4

CHAPITRE III

INTERACTIONS CATIONS-DGDG ET DGDG-DGDG

3.1. Introduction

Les lipides du PSII ont reçu beaucoup d'attention, récemment, à cause de l'avancement considérable réalisé dans la compréhension du fonctionnement de la membrane des thylacoïdes (Gounaris et al, 1983; Sprague et al, 1985; Murphy 1986). Une description précise de la relation entre l'architecture moléculaire de la bicouche lipidique et la fonction de la membrane des thylacoïdes n'est pas encore élaborée (Webb et Green, 1991).

Il a été démontré que l'empilement de la membrane des thylacoïdes dépend d'une façon directe de la concentration des espèces cationiques dans le milieu environnant (Barber, 1982). Ce phénomène est lié aux charges de surface et a fait l'objet de nombreux travaux (Staehelin et Arntzen, 1983).

La simulation du potentiel de surface de la membrane des thylacoïdes montre que l'empilement des thylacoïdes est possible si les charges de surface sont neutralisées (Barber, 1982). De nombreuses observations montrent que la neutralisation des charges négatives est à l'origine de la déshydratation des têtes polaires des lipides (Wilschut et al, 1980).

Quel rôle les cations peuvent-ils jouer dans la dissipation des barrières énergétiques d'hydratation? Une première réponse nous vient de Azfall et al (1984). Ces auteurs reconnaissent qu'il y a une modification dans l'agencement des molécules d'eau sur la surface des têtes polaires de phosphatidylcholine (PC). Une telle couche d'hydratation existe sur les surfaces constituées de DGDG (Marra, 1985). Néanmoins, sans évidence expérimentale de telles hypothèses avaient été amenées pour expliquer la coagulation des colloïdes neutres en présence des cations (Eagland, 1975). Ce dernier auteur suppose que les cations aident à dissiper la barrière d'hydratation entre les surfaces neutres. Une conséquence importante de cette perturbation des molécules d'eau est la possibilité d'établir un contact entre deux bicouches lipidiques.

L'objectif visé dans ce chapitre est de:

- 1) vérifier si la coagulation des vésicules de DGDG provient d'une fusion ou d'une agrégation et, dans ce dernier cas, nous déterminerons le seuil de concentration critique des cations monovalents et divalents (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) qui est à l'origine de coagulation;
- 2) déterminer les sites les plus probables de l'interaction sels-lipide à l'aide de la spectroscopie infrarouge.

Les expériences effectuées dans ce chapitre (minimum en duplicata) donnent des résultats similaires et reproductibles.

3.2. Résultats expérimentaux

3.2.1. Détermination du type d'interaction entre vésicules de DGDG

3.2.1.a Étude de la fusion des vésicules de Phosphatidylsérine

Théoriquement, la fusion est le mécanisme d'interaction le plus intéressant pour l'internalisation du contenu intravésiculaire des liposomes. La fusion membranaire a été largement utilisée depuis quelques années dans des domaines variés de thérapie et de cosmétologie.

Des études intensives concernant la fusion de vésicules phospholipidiques sous l'effet de cations divalents ont été décrites dans la littérature (Papahadjopoulos et al, 1990; Nir et al, 1983; Düzgünes, 1985). En utilisant la calorimétrie différentielle à balayage (DSC), Eklund (1990) a démontré que les vésicules de dimyristoylphosphatidylglycérol fusionnent sous l'effet de 600 mM de NaCl. Dans le même ordre d'idées, Liao et Prestegard (1979) ont démontré par la technique de la résonance magnétique nucléaire et de la microscopie électronique à balayage que les vésicules formées d'un mélange de phosphatidylcholine et d'acide phosphatidique peuvent fusionner dans des conditions spécifiques sous l'effet du Ca^{2+} .

Wilschut et ses collaborateurs (1981) ont trouvé par la technique d'encapsulation de fluorophore, dont l'intérêt est de pouvoir obtenir un taux élevé d'encapsulation des grosses macromolécules,

que les liposomes de phosphatidylsérine (PS), chargés négativement, fusionnaient plus efficacement sous l'influence du Ca^{2+} que du Mg^{2+} .

Deux modèles ont été proposés pour expliquer les mécanismes qui sont à l'origine de la fusion des vésicules chargées négativement. Le premier modèle suppose que la fusion est toujours précédée par une phase intermédiaire à l'interface de deux vésicules en contact (Gruner et al, 1985; Wilschut et Hoekstra, 1986), alors que le second modèle suggère que la formation d'un pont cationique entre les charges de deux vésicules en interaction est à l'origine du phénomène (Kozlov et al, 1989).

Qualitativement, les deux modèles sont en accord sur le fait que l'expulsion des molécules d'eau localisées près des groupements négatifs produit une augmentation des forces attractives entre les molécules des membranes opposées, ce qui facilite leur contact immédiat. Cependant les mécanismes de la fusion des vésicules formées d'un lipide non-ionique (DGDG) reste encore à élucider. La concentration élevée de ce lipide, approximativement 29% du total lipidique de la membrane photosynthétique, suggère que son rôle est essentiel au maintien de la structure moléculaire de l'appareil photosynthétique.

Dans le but de confirmer la validité de la technique que nous allons utiliser pour étudier la fusion des vésicules du DGDG, nous avons étudié la fusion de vésicules de PS sous l'effet de Ca^{2+} et Mg^{2+} par la technique d'encapsulation à l'aide de TbCl_3 et DPA (voir section 2.3.2.a). La Figure 3.1 montre que le Ca^{2+} stimule fortement la fusion

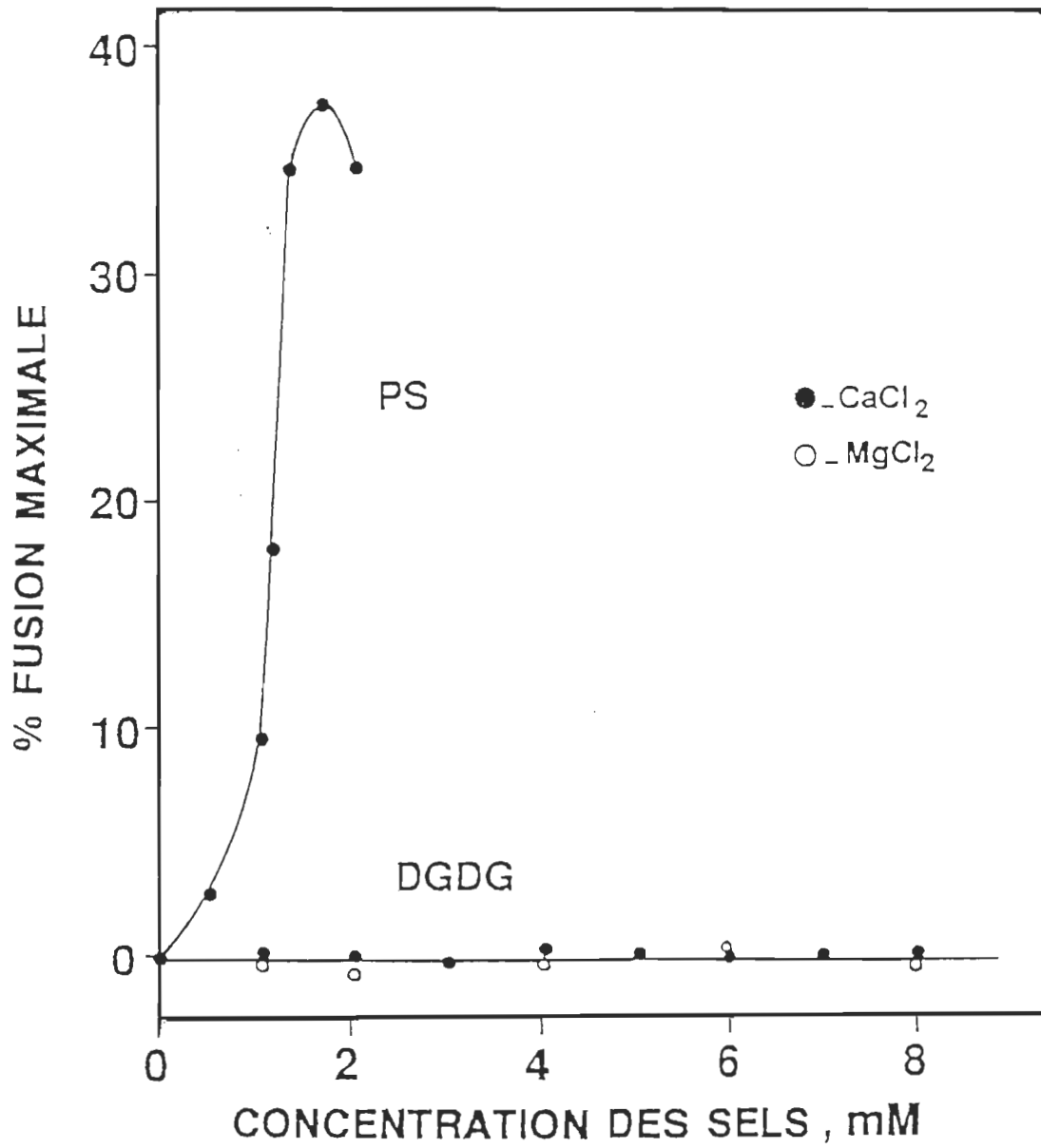


Figure 3.1 Fusion de vésicules de DGDG et de PS sous l'effet des cations divalents (●) CaCl₂, (○) MgCl₂

des vésicules de PS dès que sa concentration dépasse une concentration critique de 0.8 mM et que le maximum de fusion (37% de la fusion totale) est atteint pour une concentration du calcium de 1.5 mM, au delà de laquelle on assiste à une rapide décroissance de l'intensité de fluorescence. Cette décroissance est attribuée à la dissociation du complexe Tb/DPA par l'EDTA qui se trouve dans le milieu externe lors de la rupture de la membrane globale (Ohki, 1982). Il a été aussi observé que le Mg^{2+} n'induit pas la fusion des vésicules de PS (Wilschut et al, 1981).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Ohki (1982), quoique la concentration critique trouvée dans ce travail soit légèrement différente. Cette différence a été observée également par Düzgünes et al (1981) dans le même type d'expérience, lorsque la concentration du milieu en NaCl variait de 100 mM à 3 mM.

3.2.1.b. Démonstration de l'absence de fusion des vésicules de DGDG

Nous voulons déterminer si la fusion de vésicules de DGDG est possible sous l'influence des ions calcium et magnésium. Pour ce faire nous avons suivi la variation d'intensité de fluorescence d'un mélange 1:1 de deux populations de vésicules différentes contenant respectivement le $TbCl_3$ et le DPA par la même technique qui a été utilisée précédemment pour étudier la fusion des vésicules de PS.

La Figure 3.1 montre que l'intensité de fluorescence du mélange

des deux populations de vésicules du DGDG ne varie presque pas avec l'augmentation de la concentration des sels (Ca^{2+} , Mg^{2+}) présents dans la suspension aqueuse, même à des concentrations supérieures à la concentration critique d'agrégation des vésicules de DGDG qui sont 1 mM et 4.7 mM pour le calcium et le magnésium, respectivement. Nous concluons donc que les vésicules du DGDG ne se fusionnent pas sous l'effet de Ca^{2+} et de Mg^{2+} .

3.2.1.c. Agrégation et réversibilité d'agrégation des vésicules de DGDG

L'agrégation des vésicules du DGDG a été suivie en mesurant l'augmentation de la turbidité à 600 nm d'une suspension de vésicules de DGDG dans l'eau deutérée sous l'effet des différentes concentrations des cations monovalents et divalents (Figure 3.2). Le titrage de la solution de DGDG par les cations produit une légère augmentation de la turbidité au début suivie d'un accroissement rapide lorsque la concentration des cations dépasse une concentration critique spécifique à chaque espèce cationique.

Les équations représentatives des courbes tracées à travers les points expérimentaux sont obtenues par ajustement des valeurs observées par un polynôme de cinquième degré à l'aide du programme Cricket-Graph, version 1.3.2, de Cricket Software Inc. (Malven, PA). Il faut remarquer que ces courbes sont empiriques et qu'elles ont été tracées dans le seul but de faciliter la détermination de la concentration critique de coagulation.

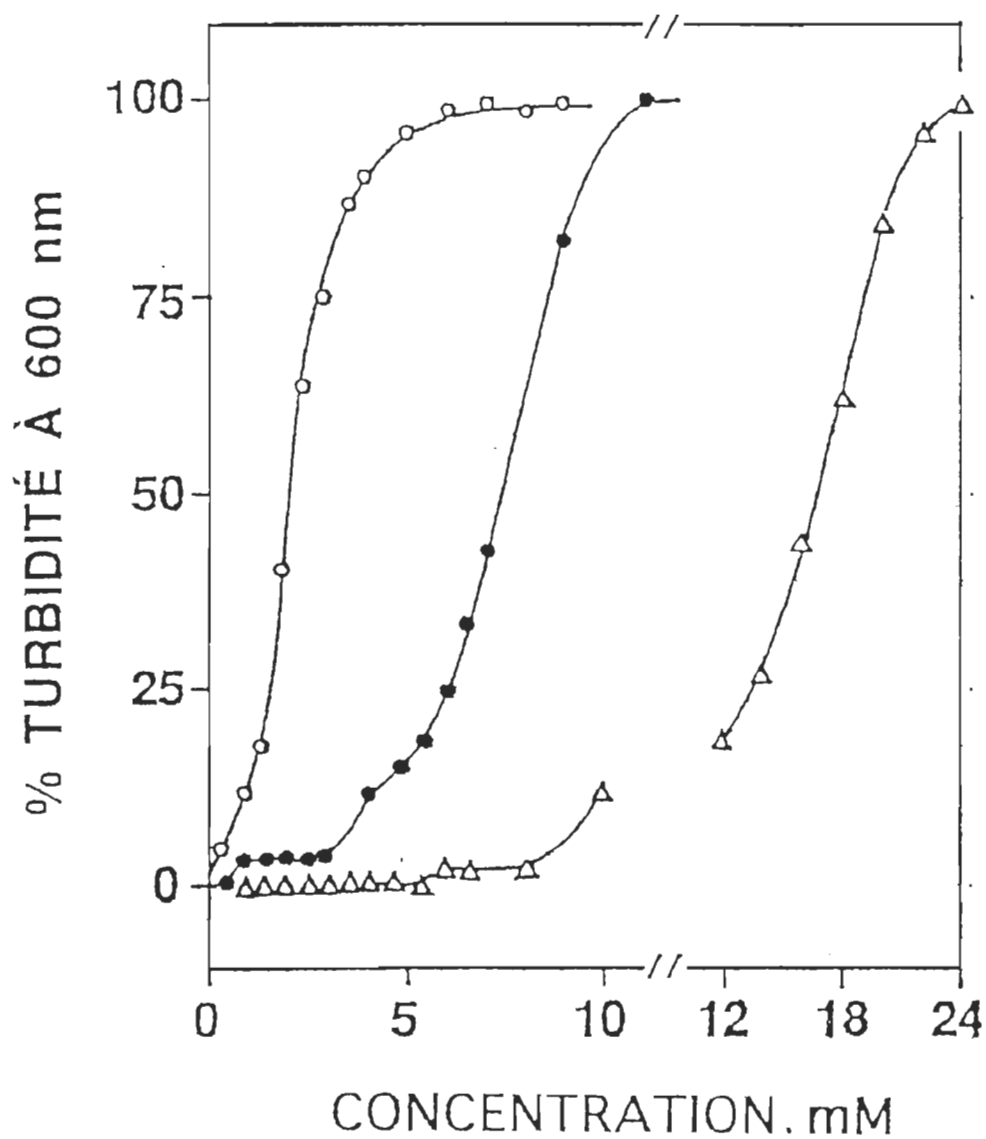


Figure 3.2 Turbidité à 600 nm des vésicules de DGDG (o) CaCl₂; (●) MgCl₂; (Δ) NaCl

La concentration critique nécessaire à la coagulation des vésicules est déterminée en calculant le point d'inflexion de chaque courbe, puis, à partir de ce point d'inflexion, nous avons déduit graphiquement la concentration critique à partir de laquelle l'agrégation commence à avoir lieu. Les concentrations critiques trouvées sont, 1.0, 4.7 et 10.0 mM, pour le Ca^{2+} , le Mg^{2+} et le Na^{+} , respectivement. Ces valeurs sont très proches de celles obtenues par Webb et al (1988) dans le même type d'expérience.

Une simple comparaison des trois cations utilisés dans ce travail montre que le calcium se distingue des deux autres par son efficacité à promouvoir l'agrégation membranaire. Il suffit de 1 à 2 mM de CaCl_2 pour que l'agrégation commence à se produire. Ensuite, vient le MgCl_2 avec une concentration critique d'à peu près quatre à cinq fois plus grande que celle du CaCl_2 , puis le NaCl avec une concentration de 10 fois supérieure à celle du CaCl_2 .

Dans le but de confirmer l'agrégation, sans fusion, des vésicules lipidiques, nous avons étudié la réversibilité d'agrégation des vésicules du DGDG sous l'effet d'EDTA. Cette technique a été appliquée avec succès par plusieurs chercheurs à plusieurs reprises pour étudier l'agrégation et la fusion des vésicules de PS (Ohki, 1982, Düzgünes et al, 1987). En effet, la Figure 3.3 illustre la réversibilité de la turbidité des vésicules du DGDG, préalablement agrégées sous l'effet des cations divalents, dans l'eau deutérée. Nous observons une suppression presque complète de la turbidité pour une concentration de 12 mM d'EDTA.

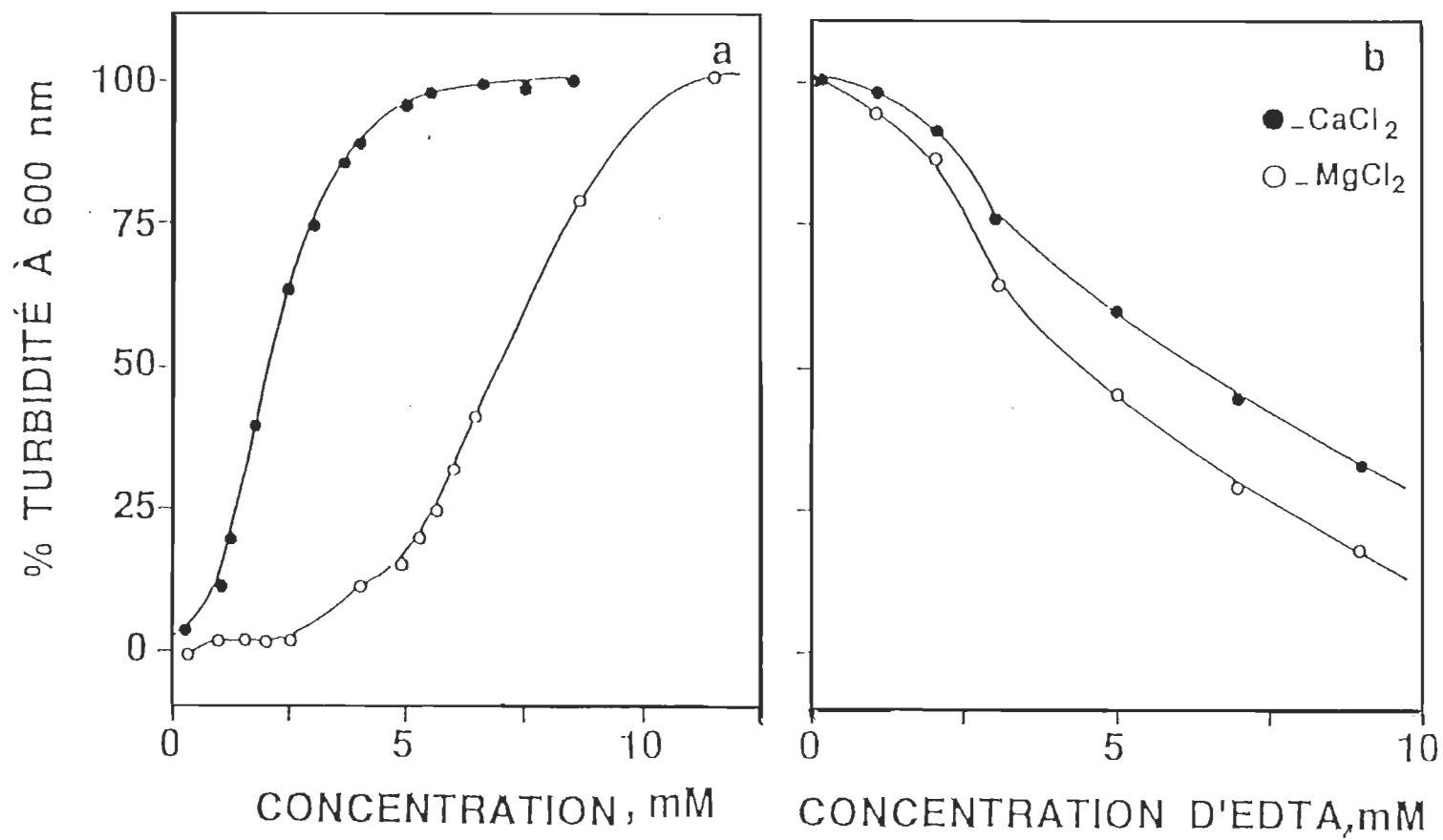


Figure 3.3 Turbidité directe (a) et inverse (b) des vésicules de DGDG dans l'eau deutérée

3.2.2. Étude des interactions cations-DGDG et DGDG-DGDG par spectroscopie infrarouge.

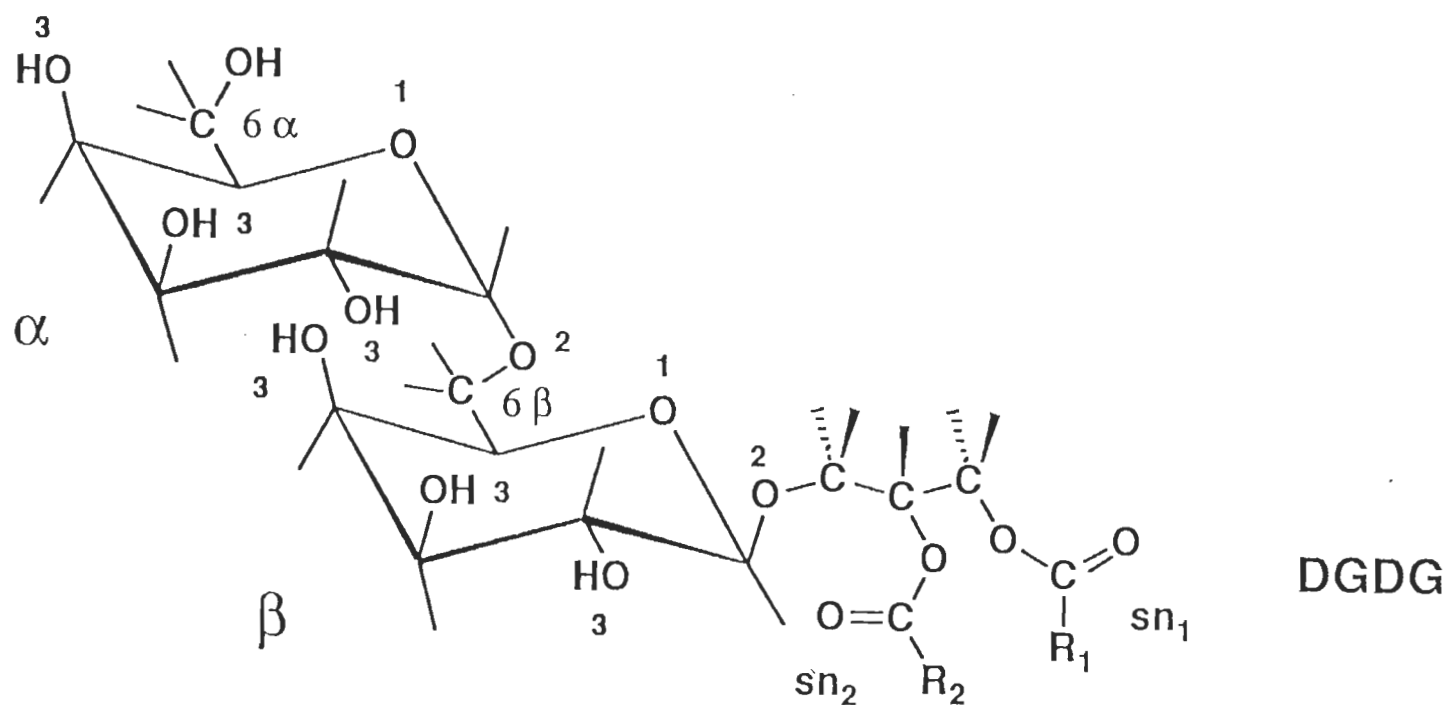
Nous avons vu que les cations monovalents et divalents sont capables de promouvoir l'agrégation des vésicules lipidiques du DGDG. Dans le but d'étudier les mécanismes structuraux qui sont à l'origine de cette agrégation, nous avons utilisé la spectroscopie ir. Cette technique offre la possibilité d'étudier les interactions moléculaires qui peuvent avoir lieu entre les sels et la molécule de DGDG.

3.2.2.a. Modes vibrationnels du DGDG

3.2.2.a.1. Modes vibrationnels du galactose et du glycérol

La Figure 3.4 donne la structure chimique du DGDG. On y note la présence de deux résidus de galactose, un résidu de glycérol et deux chaînes d'acide gras en position 1 et 2 du résidu de glycérol. Les spectres d'absorption infrarouges (absorbance et 2^{ème} dérivée) de DGDG et du galactose dans la région $1800-900\text{ cm}^{-1}$ sont donnés dans la Figure 3.5. Dans cette région, les fréquences caractéristiques des vibrations des bandes principales du galactose et du glycérol sont les suivantes (Tableau 3.1):

a) Dans la région spectrale $1460-1210\text{ cm}^{-1}$ les modes de vibration du galactose sont dominés par les vibrations de déformation des liaisons $\delta(\text{OCH})$, $\delta(\text{CCH})$. La bande de vibration localisée à 1458 cm^{-1} est superposée avec le mode de déformation $\delta(\text{CH}_2)$, alors que



α = anomère- α

β = anomère- β

R_1, R_2 = chaînes acyles

sn_1 = ester libre $C=O$

sn_2 = ester lié $C=O$

1: anneau d'oxygène (COC)

2: pont d'oxygène

3: anneau OH (COH)

4, 5: comme 3

6α : carbone 6α

6β : carbone 6β

Figure 3.4 Structure chimique de la molécule de DGDG

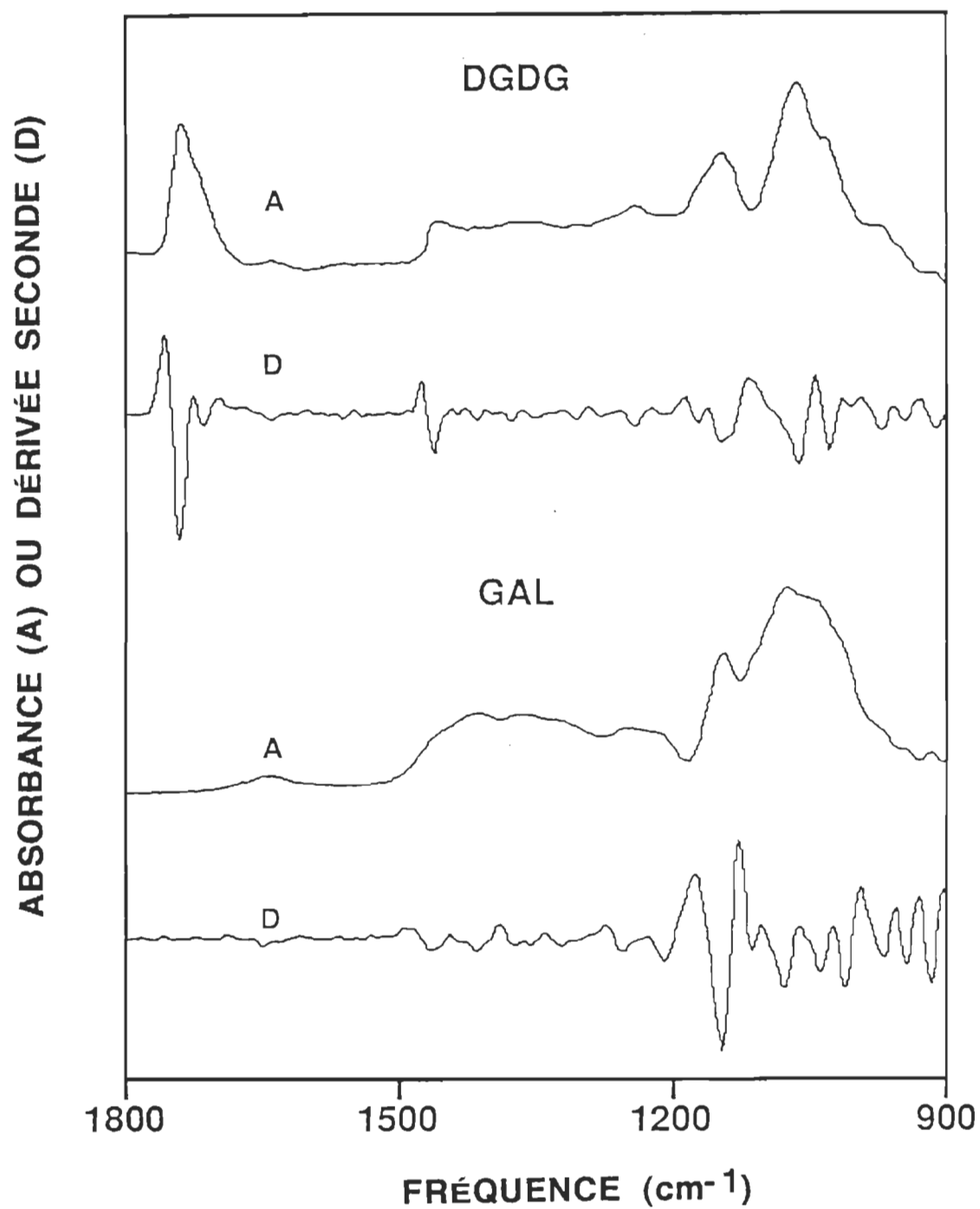


Figure 3.5 Spectres d'absorption ir du DGDG et du galactose dans D₂O. (A) Spectres d'absorption. (D) Spectres de dérivée seconde.

(Menikh et Fragata, 1993)

Tableau 3.1 Fréquences caractéristiques des bandes infrarouges du glycérol, du galactose et du digalactosyldiacylglycérol

Molécule			Attribution ^d des bandes	Refs. ^e
Glycérol ^a	Galactose ^b	DGDG ^c		
		1741 m	ν (C=O), π_1	1-4
		1715 s	ν (C=O), π_2	1-4
1455	1458	1466 s	δ (OCH), δ (CCH), δ (CH ₂)	1,2,5-7
		1453 m	δ (OCH), δ (CCH), δ (CH ₂)	1,2,5-7
1415	1418	1419 m	δ (OCH), δ (CCH)	5,6
		1407 m	δ (OCH), δ (CCH)	5,6
	1374	1378 m	δ (OCH), δ (CCH), δ (COH)	1,2,5,6
	1242	1246 m	δ (OCH), δ (CCH), δ (COH)	5,6
1235		1236 s	δ (OCH), δ (CCH), δ (COH)	5,6
1210	1211	1211 m	δ (OCH), δ (CCH), δ (COH)	5,6
		1175 s	ν (CO), ν (CC), δ (OCH), δ (CCH)	5,6
		1163 s	ν (CO), ν (CC), ν_{as} (COC) ^f	5-8
	1147	1149 m	ν (CO), ν (CC)	5,6
1111	1116	1117 d	ν (CO), ν (CC), δ (CCC)	5,6
	1055	1062 m	ν (CO), ν (CC), δ (COH)	7
1043	1046	1047 s	ν (CO), ν (CC), δ (CCO)	5,6
		1031 s	ν (CO), ν (CC)	5,6

^aPachler et al, 1988. ^bSelon la figure 3.5. ^cMenikh et Fragata, 1993. ^dCes attributions ont été faites en partie d'après des travaux faits sur des glucides divers. ^e1. Fookson et Wallach, 1978; 2. Mantsch et al, 1981; 3. Mushayakarara et al, 1982; 4. Blume et al, 1988; 5. Tajmir-Riahi, 1988a,b; 6. Fringeli et Gunthard, 1981; 7. Parker, 1971; 8. Marchessault et Liang, 1962. ^fvibration d'étirement antisymétrique du pont d'oxygène (voir Parker, 1971; Marchessault et Liang, 1962). Abréviations: δ , déformation; d, faible; ν , étirement; m, maximum; s, épaulement.

les bandes situées à 1374 cm^{-1} , à 1242 cm^{-1} et à 1211 cm^{-1} sont superposées avec le mode de déformation $\delta(\text{COH})$. Par ailleurs, dans la région spectrale $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ les modes de vibration du galactose sont dominés par les modes d'élongation $\nu(\text{C-O})$ et $\nu(\text{C-C})$. De plus, les bandes de vibration des liaisons situées à 1116 cm^{-1} , à 1055 cm^{-1} et à 1046 cm^{-1} contiennent les modes de déformation $\delta(\text{CCC})$, $\delta(\text{COH})$, $\delta(\text{CCO})$, respectivement.

b) La position des bandes du glycérol a été obtenue de Merck FTIR Atlas (Pachler et al, 1988). Les bandes les plus importantes de spectre du glycérol résultent des vibrations d'élongation des groupements $\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{C-C})$ et des vibrations de déformation des liaisons $\delta(\text{CCH})$, $\delta(\text{COH})$, $\delta(\text{OCH})$, $\delta(\text{CH}_2)$. Plus spécifiquement, dans la région comprise entre $1460\text{-}1040\text{ cm}^{-1}$ nous observons deux bandes, une située à 1455 cm^{-1} et l'autre à 1415 cm^{-1} , résultant des déformations des liaisons $\delta(\text{OCH})$, $\delta(\text{CCH})$. Les bandes situées à 1235 cm^{-1} et à 1210 cm^{-1} sont attribuées aux déformations $\delta(\text{OCH})$, $\delta(\text{CCH})$, $\delta(\text{COH})$. Par contre, les bandes localisées à 1111 cm^{-1} et à 1043 cm^{-1} renferment les modes d'élongation $\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{CC})$. Ces modes sont généralement superposés aux modes de déformation $\delta(\text{CCC})$, $\delta(\text{CCO})$, respectivement.

3.2.2.a.2 Région de déformation des résidus de glycérol et de galactose dans le DGDG ($1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$)

Le spectre infrarouge du DGDG est donnée dans la Figure 3.5. Dans cette région spectrale (Tableau 3.1), la superposition des

vibrations de déformation $\delta(\text{OCH})$, $\delta(\text{CCH})$ et $\delta(\text{CH}_2)$ des carbones 1 et 3 du glycérol et du carbone 6 du galactose donne naissance à un certain nombre de bandes situées entre $1458\text{-}1455\text{ cm}^{-1}$ et $1418\text{-}1415\text{ cm}^{-1}$. Ces attributions ont été faites d'après les travaux de Tajmir-Riahi, (1988a,b) et Fringeli et Günthard (1981) sur des glucides semblables.

L'attribution des bandes d'absorption, situées à 1466 cm^{-1} et à 1453 cm^{-1} n'est pas simple. Les travaux de Parker (1971) et de Tajmir-Riahi (1988a,b) sur les carbohydrates suggèrent que la bande située à 1466 cm^{-1} peut être attribuée au mode de déformation $\delta(\text{CH}_2)$ du carbone-6 de l'anomère- α ou de l'anomère- β du galactose. Néanmoins, l'effet des ions sur les modes de vibration du DGDG (voir section 3.2.2.b) montre que les bandes situées à 1466 et 1453 cm^{-1} sont attribuées au groupement $\text{C}_{6\alpha}\text{OH}$ autour du carbone-6 de l'anomère- α . Les bandes situées à 1419 cm^{-1} et 1407 cm^{-1} sont attribuées, respectivement, aux modes de déformation $\delta(\text{OCH})$ et $\delta(\text{CCH})$ de l'oxygène et des carbones dans le cycle du galactose. Par ailleurs, les bandes situées à 1246 cm^{-1} , à 1236 cm^{-1} et à 1211 cm^{-1} sont attribuées, respectivement, aux modes $\delta(\text{OCH})$, $\delta(\text{CCH})$ et $\delta(\text{COH})$ du galactose.

3.2.2.a.3 Région d'élongation des résidus de glycérol et de galactose dans le DGDG ($1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$)

Dans cette région spectrale (Tableau 3.1) on note plus particulièrement les bandes situées à 1163 cm^{-1} , à 1149 cm^{-1} , à

1147 cm^{-1} , à 1062 cm^{-1} , à 1055 cm^{-1} , à 1047 cm^{-1} et à 1031 cm^{-1} . Ces bandes sont largement dominées par les modes d'élongation hors plan des groupements C-O et C-C du galactose et du glycérol dans le DGDG (Parker, 1971; Fringeli et Günthard, 1981). La fréquence de vibration située à 1163 cm^{-1} est généralement superposée à la fréquence d'élongation antisymétrique de COC du pont du galactose entre l'anomère- α et l'anomère- β (Marchessault et Liang, 1962; Parker, 1971). Les bandes situées à 1062 cm^{-1} et à 1047 cm^{-1} contiennent certains modes de déformation, notamment $\delta(\text{COH})$ et $\delta(\text{CCO})$, (Tajmir-Riahi, 1988a,b; Fringeli et Gunthard, 1981).

3.2.2.a.4. Région du carbonyle de l'ester du DGDG (1750-1710 cm^{-1})

Le spectre d'absorption du DGDG dans la région 1750-1710 cm^{-1} a deux bandes principales. L'une située à 1741 cm^{-1} , attribuée à l'étirement de l'ester libre (ν_1). L'autre située à 1715 cm^{-1} , clairement montrée sur le spectre de seconde dérivée (Figure 3.6), attribuée à l'étirement de l'ester lié (ν_2) par l'hydrogène du groupement $\text{C}_6\alpha\text{OH}$. Néanmoins, nous avons observé par la technique de la simulation spectrale que la fréquence de l'ester lié (ν_2) est située à 1723 cm^{-1} (Figure 3.7). Ces attributions ont été faites d'après la modélisation discutée dans la partie 3.3.1, elles diffèrent de celles données par Blume et al (1988) et Lewis et McElhaney (1992, 1993) sur le $^{13}\text{C}=\text{O}$ (la discussion détaillée de cette région sera faite dans la section 3.4).

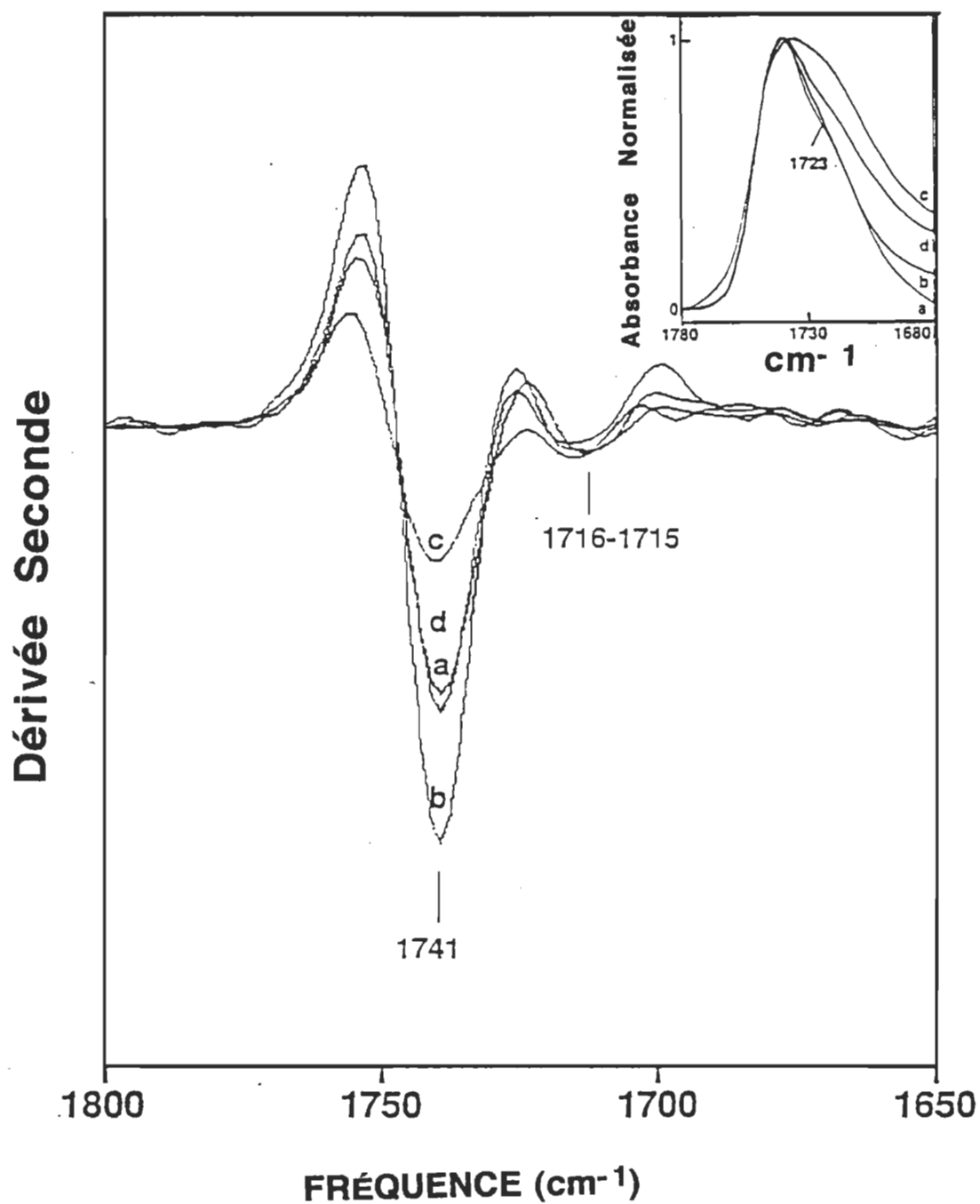


Figure 3.6 Dérivée seconde des spectres d'absorption ir du DGDG dans D₂O entre 1800-1650 cm⁻¹.

Figure insérée: Spectres d'absorption ir du DGDG dans D₂O entre 1780-1680 cm⁻¹. (a) Sans sel; (b) 18 mM NaCl; (c) 18 mM MgCl₂; (d) 10 mM CaCl₂...

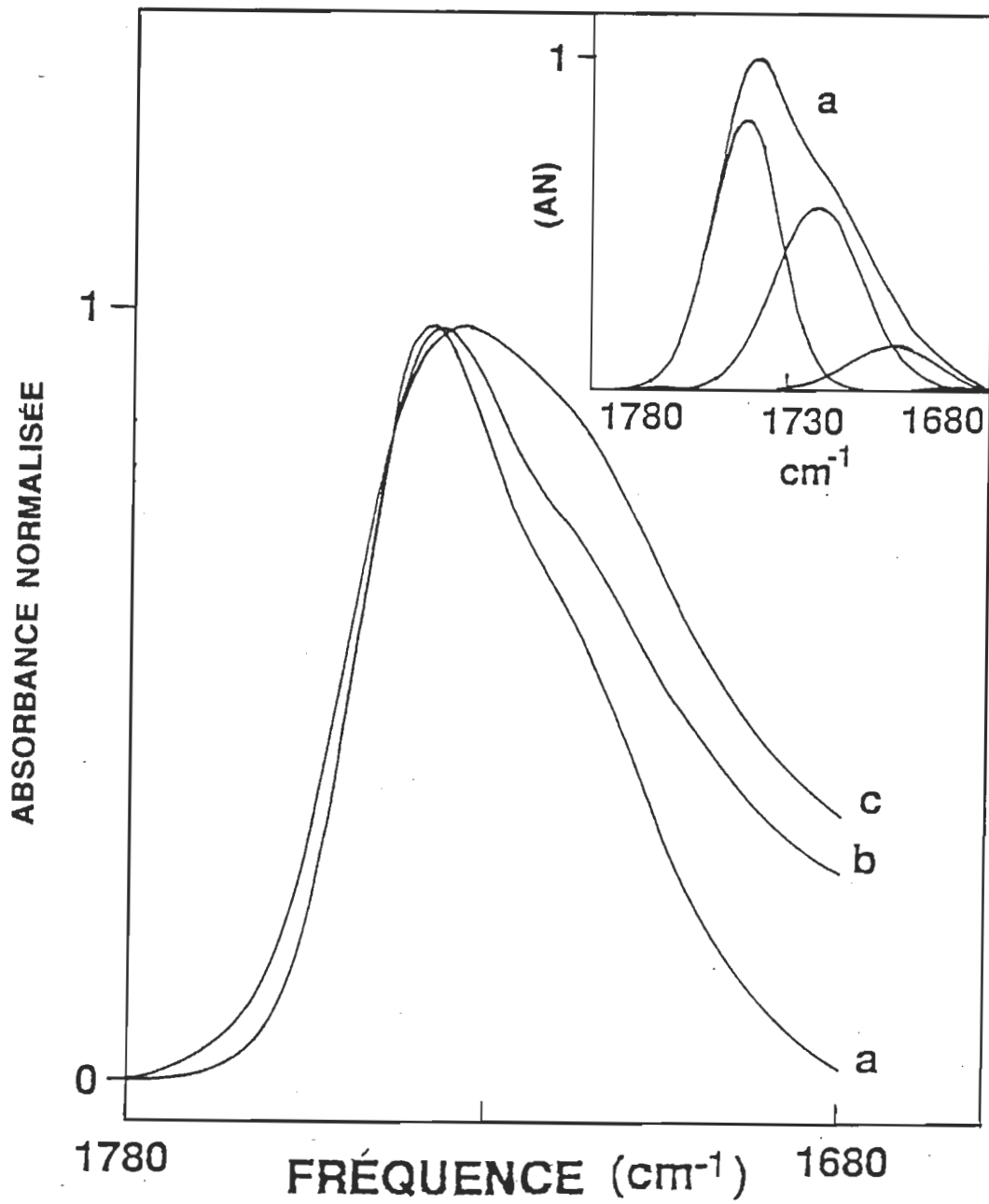


Figure 3.7 Spectres normalisés d'absorption ir des vésicules du DGDG dans D₂O. (a) Sans sel; (b) 10 mM CaCl₂; (c) 18 mM MgCl₂

Figure insérée: simulation de l'enveloppe spectrale (a)

glucosyldiacylglycérols, c'est-à-dire $\text{Glc}\alpha 1\text{-3DAG}$ et $\text{Glc}\beta 1\text{-3DAG}$, par Mannock et al (1990), indique que le $\text{Glc}\beta 1\text{-3DAG}$ a une seule et unique bande dans la région du carbonyl ester, alors que $\text{Glc}\alpha 1\text{-3DAG}$ a deux bandes distinctes. La bande a faible fréquence a été attribuée à l'ester sn_2 , lié par l'hydrogène du 2^{ème} hydroxyle de l'anomère- β . Par contre, la bande a haute fréquence a été attribuée à l'ester libre sn_1 .

3.2.2.b Effets des ions sur les modes vibrationnels du DGDG

Les Tableaux 3.2 et 3.3 montrent l'effet du NaCl , du MgCl_2 et du CaCl_2 sur les bandes d'absorption infrarouge du lipide dans la région $1800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. On note la présence de deux régions spectrales où les fréquences des vibrations n'ont pas été affectées par la présence des cations monovalents et divalents. La première région, $1750\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$, concerne le groupement ester, la seconde est localisée entre 1470 et 1450 cm^{-1} . Dans cette dernière région on observe deux bandes, l'une situées à 1466 cm^{-1} et l'autre à 1453 cm^{-1} , attribuées aux modes de déformation $\delta(\text{OCH})$, $\delta(\text{CCH})$ et $\delta(\text{CH}_2)$ autour du carbone 6 de l'anomère- α .

L'absence d'interaction des sels avec le groupement ester est due, à notre avis, soit à la protection de ce site moléculaire par la tête polaire du lipide contre l'action de sels soit à l'incapacité des sels de pénétrer dans cette région interfaciale (section 3.3.1). Il est

Tableau 3.2 Effets des sels sur les fréquences d'absorption ir de la tête polaire du digalactosyldiacylglycérol^a

Concentration des sels			
Pas de sel	NaCl 18 mM	MgCl ₂ 18 mM	CaCl ₂ 10 mM
1750-1710 cm ⁻¹			
1 741	1 741	1 741	1 741
1 723	1 724	1 724	1 723
1 500-1 200 cm ⁻¹			
1 466	1 466	1 466	1 466
1 453	1 453	1 454	1 455
1 419	1 415	1 415	1 415
1 407	1 398	1 400	1 398
1 378	1 379	1 380	1 379
1 246	1 251	1 248	1 250
1 236	1 240	1 240	1 242
1 211	1 209	1 213	1 213
1 200-1 000 cm ⁻¹			
1 175	1 175	1 175	1 175
1 163	1 159	1 159	1 160
1 149	1 150	1 149	1 149
1 117	1 117	1 116	1 116
1 062	1 066	1 065	1 067
1 047	1 057	1 053	1 057
1 031	1 031	1 031	1 031

a: voir tableau 3.3

Tableau 3. 3 Étude par spectroscopie ir de l'effet des cations
sur la tête polaire du digalactosyldiacylglycérol.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Attribution	Site moléculaire	Déplacement (cm ⁻¹)	Effets probables
1 1723 s	ν (C=O)	sn ₂ C=O	NS	Pas de complexation ionique
2 1466 s 1453 m	δ (OCH), δ (CCH), δ (CH ₂)	C ₆ α OH	NS	
3 1419 m 1407 m	δ (OCH), δ (CCH)	aCOC	↓	Complexation ionique
4 1246 m 1236 s	δ (OCH), δ (CCH), δ (COH)	aCOH	↑	Complexation ionique et/ou interaction DGDG-DGDG
5 1163 s	ν (CO), ν (CC), ν_{as} (COC)	pCOC	↓	
6 1062 m	ν (CO), ν (CC), δ (COH)	aCOH	↑	
7 1047 s	ν (CO), ν (CC), δ (COH)	aCOH	↑	e

a, anneau; δ , déformation; e, non identifié; m, maximum; NS, pas de déplacement; p, pont; ν , étirement; s, épaulement; ↓, décroissance; ↑, croissance.

important de noter que ces résultats diffèrent de ceux obtenus avec le phosphatidylglycérol (PG) qui montrent bien une nette interaction des sels avec les groupements ester de carbonyle (Nénonéné, 1992). Sur la base de ces données et des résultats de la section 3.3.1, nous avons proposé l'existence d'une liaison hydrogène entre le groupement carbonyle sn_2 ($C=O$) et l'hydroxyle du groupement $C_{6\alpha}OH$ de la tête polaire du lipide étudié.

L'effet des sels sur la tête polaire se limite plus particulièrement au niveau de quelques sites spécifiques. De ce fait, le déplacement vers les basses fréquences de la transition identifiée numéro 3 dans le Tableau 3.3 se traduit par une complexation ionique avec le groupement COC de l'anneau du galactose à travers l'atome d'oxygène. Une conséquence importante de cette interaction est la dissipation de la barrière énergétique d'hydratation entre les surfaces opposées.

La transition numéro 4 (Tableau 3.3) résulte soit de la complexation des ions avec les groupements hydroxyles du galactose, soit de l'interaction DGDG-DGDG (voir discussion dans la section 3.4). Néanmoins, cette dernière interaction est favorisée à cause de la déshydratation de la tête polaire du lipide par les sels. Ce point de vue reste aussi valable pour la transition numéro 5 (Tableau 3.3) qui représente le groupement COC du pont de galactose. Enfin, les effets des transitions numéros 6 et 7 n'ont pas pu être identifiées, et ce, malgré une étude intensive de la littérature. Nous devons toutefois ajouter que les fréquences des bandes de cette partie sont le résultat de la moyenne de trois expériences différentes avec un écart type

maximal de $\pm 0.2 \text{ cm}^{-1}$ et qu'en présence des sels les spectres d'absorption infrarouges dans la région des élongations C-H ne révèlent aucun déplacement appréciable des fréquences.

3.3 Etude théoriques

3.3.1 Modélisation de la molécule du DGDG à l'aide de la minimisation d'énergie

Afin de mettre en pratique un modèle théorique qui permettrait d'expliquer l'agrégation sans fusion des vésicules de DGDG, nous avons calculé la configuration correspondant à l'énergie minimale de la molécule du DGDG.

Le programme utilisé dans cet étude est le Chem3D-Plus, version 3.0, de la compagnie Cambridge Scientific Computing (Cambridge, MA), basé principalement sur les travaux de Jay W. Ponder de l'Université de Washington (Burkert et Alinger, 1982). Les modifications qui sont apportées à ce programme par rapport au champ de force d'Alinger sont:

- 1- L'énergie potentielle asymétrique des liaisons longues entre atomes est corrigée à l'aide d'un polynôme du 4^{ième} degré vu que la loi de Hooke ne la décrit pas correctement (Rosenbaum, 1970).
- 2 - Les paramètres qui définissent la distance minimale à partir de laquelle les interactions (i) charge/charge, (ii) charge/dipôle,

(iii) dipôle/dipôle et (iv) interactions de van der Waals, commencent à diminuer ont été introduits. Ces distances sont 30 Å, 25 Å, 28 Å et 10 Å. respectivement pour les interactions (i), (ii), (iii) et (iv).

3 - Le terme exponentiel dû à la répulsion à courte distance est remplacé par un terme quadratique de van der Waals.

La structure chimique du lipide utilisé est constituée par deux groupements de galactose et un de glycérol auxquels sont attachés au carbone C₂ une chaîne d'acide stéarique et au carbone C₃ une chaîne d'acide oléique.

Après traitement de cette structure par ordinateur, la configuration trouvée (Figure 3.8) présente une distance minimale de 2.116 Å entre le groupement carbonyle ester sn₂ et l'hydrogène de l'hydroxyle du carbone 6 de l'anomère- α du galactose. Cette distance permet l'établissement d'une liaison hydrogène qui pourrait empêcher l'accès des sels à cette région interfaciale. Ce résultat de la simulation est obtenu dans le vide c'est-à-dire pour une seule molécule de DGDG et sans la compétition des molécules d'eau lourde. En pratique ce site pourrait, probablement, entrer en compétition avec d'autres situations pour former une liaison intermoléculaire, soit avec les molécules d'eau lourde, soit avec les autres molécules de DGDG. L'avantage principal de ce modèle réside dans son habileté à définir, en première approximation, la configuration adoptée par la tête polaire de lipide, dont la tendance à piéger les molécules d'eau

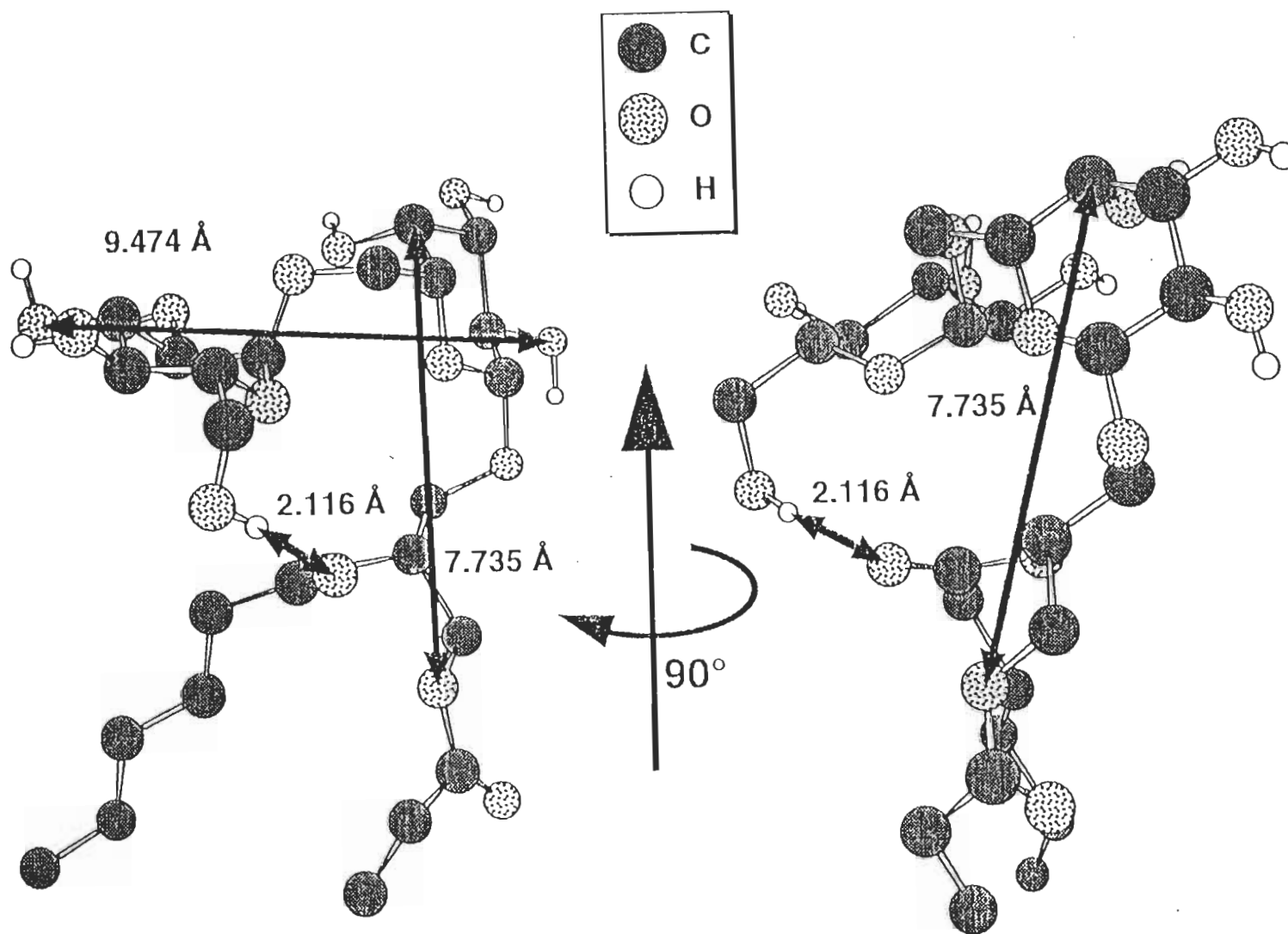


Figure 3.8 Minimisation énergétique de la molécule de DGDG obtenue par le champ de force MM2

est importante à cause de ses groupements hydroxyles qui pointent vers l'extérieur. L'épaisseur de la région de la tête polaire estimée à partir de ce modèle a un minimum de 7.735 Å et un maximum de 9 Å, alors que la largeur de sa coupe transversale varie approximativement entre 9.5 et 10.5 Å. À partir de ces données, nous avons déterminé la surface moyenne occupée par la tête polaire de lipide qui est 84 Å². Nous devons ajouter que ces résultats de la modélisation sont en accord avec ceux obtenus par diffraction des neutrons (McDaniel, 1988) et par la technique de monocouche (Bishop et al, 1980; Marra, 1985) ainsi que par la technique de mesure de force de surface (Marra, 1986).

3.3.2 Effets du champ électrique créé par les cations divalents sur le groupement carbonyle de l'ester sn₂

Nous avons vu précédemment par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier que la bande du carbonyle de l'ester sn₂ du DGDG ne semble pas affectée par la présence des cations divalents (section 3.2.2.b). Néanmoins, l'analyse de cette bande par la méthode de simulation spectrale nous montre que l'intensité intégrale relative (%A) de l'ester lié sn₂ est augmentée en présence du MgCl₂ ou du CaCl₂ (Tableau 3.4). Le tableau 3.4 montre qu'en absence des sels %A est égal à 39.8±0.8 tandis qu'en présence de CaCl₂ et MgCl₂ %A est égal respectivement à 44.5±3.8 et 48.4±3.7. Malgré la marge d'erreur élevée, ceci est une bonne indication de la variation de %A en fonction de la présence des sels. En effet, la Figure 3.7 montre bien qu'il

Tableau 3.4 Effets des sels sur l'intensité intégrale (%A) et la fréquence d'absorption maximale de l'ester lié (sn₂)

Concentration des sels ^a	$\bar{\nu}_{\max, b}$ cm ⁻¹	%A ^c
0	1 723.0 ± 0.7 ^d	39.8 ± 0.8
10 mM CaCl ₂	1 723.7 ± 1.4	44.5 ± 3.8
18 mM MgCl ₂	1 723.7 ± 0.6	48.4 ± 3.7

- a La concentration utilisée est supérieure à la concentration critique d'agrégation des vésicules lipidiques (voir section 3.2.1).
- b $\bar{\nu}_{\max}$ (nombre d'onde) est obtenu à partir de la simulation spectrale de l'enveloppe.
- c Intensité de la bande sn₂ donnée en pourcentage de l'intensité totale (enveloppe spectrale totale)
- d Écart-type.

existe une différence réelle entre le spectre de DGDG en absence de sels et les spectres pris en présence de CaCl_2 et MgCl_2 .

Malgré le fait que l'augmentation de l'intensité intégrale de l'ester lié sn_2 a été observée également dans les phospholipides sous l'effet de température (voir e.g., Casal et Mantsch, 1984) et a été interprétée en terme de réorganisation de l'interface, nous pensons que dans le cas présent l'effet du champélectrique crée par les cations divalents sur le moment de dipolaire de l'ester lié est plus important que l'effet des cations sur la réorganisation de l'interface. Dans ce cas nous avons (Painter et al, 1982).

$$I_k(\bar{\nu}) = c \left| \frac{\partial \bar{\mu}}{\partial x} \right|^2 \quad 3.1$$

où

$\bar{\nu}$: est le nombre d'onde

c : la constante de proportionnalité

x : la coordonnée de déplacement

$\bar{\mu}$: le moment de transition dipolaire, donné par

$$\bar{\mu} = \langle \Phi_f | Q_q | \Phi_i \rangle \frac{\partial \bar{\mu}_0}{\partial Q_q} \quad 3.2$$

où $\frac{\partial \bar{\mu}_0}{\partial Q_q}$ représente la variation du moment dipolaire permanent en fonction de la coordonnée normale Q_q des noyaux, et Φ_i et Φ_f sont, respectivement, les fonctions d'onde de l'état initial et de l'état final.

Pour tenir compte de l'effet des cations divalents sur le

moment de transition dipolaire de l'ester lié sn_2 , nous multiplions les équations 3.1 et 3.2 par un facteur qui est proportionnel au champ électrique créé par les cations. Il est raisonnable de poser comme première approximation (Fragata et al, 1993):

$$I_k(\vec{v}) = c \left| \frac{\partial k_{\alpha} \vec{\mu}}{\partial x} \right|^2 \quad 3.3$$

Le champ électrique créé par la charge Q_a , i.e, Mg^{2+} ou Ca^{2+} , en un point de charge Q_b , c'est-à-dire sn_2 ($C=O$), est donné par l'expression classique suivante:

$$E_c = \frac{Q_a}{4 \pi \epsilon_0 \epsilon r^2} \vec{r}_1 \quad 3.4$$

où

ϵ : constante diélectrique

ϵ_0 : permittivité du vide

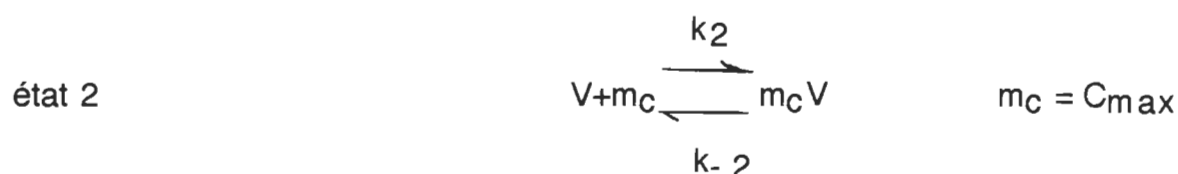
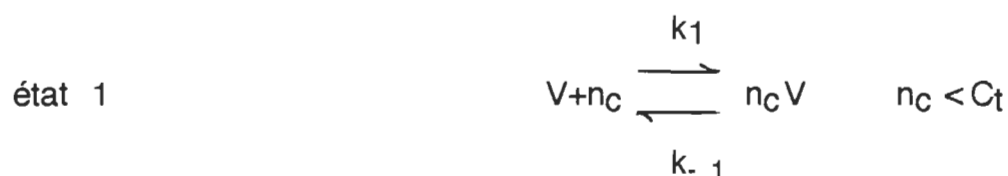
\vec{r} : vecteur unitaire qui pointe de Q_a à Q_b

r : distance entre le cation considéré et l'ester sn_2 .

De l'équation 3.3 et du Tableau 3.4, nous pouvons déduire que l'intensité du champ électrique produit par Mg^{2+} est plus importante que celle du Ca^{2+} . Ceci signifie, d'après l'équation 3.4, que la distance entre le groupement sn_2 et le Mg^{2+} est plus petite que la distance entre sn_2 et le Ca^{2+} .

3.3.3 Perturbation de la polarité de l'interface DGDG-eau

Le mécanisme proposé pour passer d'un état non-agrégé (état 1) à un état agrégé (état 2) peut être décrit par les équations d'équilibre suivantes (Fragata et al, 1993):



où

V : concentration des vésicules

C_t : concentration cationique critique de la coagulation

m_c : concentration de sel correspondant à l'agrégation maximale des vésicules

n_c : concentration des cations avant que l'agrégation ait lieu.

Les coefficients d'équilibre (K_1 , K_2) de chaque état et les variations de leurs énergies libres (ΔG_1 , ΔG_2) sont donnés par:

$$K_1 = [n_c V] / [V] [n_c]$$

$$K_2 = [m_c V] / [V] [m_c]$$

et $\Delta G_1 = -RT \ln K_1$

$$\Delta G_2 = -RT \ln K_2$$

où

R: constante des gaz

T: température en degrés Kelvin

L'énergie de transition de l'état 1 à l'état 2 est donnée par

$$\Delta\Delta G = \Delta G_1 - \Delta G_2 = -RT \ln \frac{K_1}{K_2}$$

$$\text{ou} \quad \Delta\Delta G = -RT \ln \frac{[m_c][n_c v]}{[n_c][m_c v]}$$

Si nous faisons l'hypothèse suivante:

$$\frac{[n_c v]}{[m_c v]} \approx 1$$

qui correspondrait dans le cas d'une dimérisation, par exemple, à $m_c v = \frac{1}{2} n_c (2v)$ dû à l'augmentation du volume des particules concomitante avec la baisse de la concentration des cations disponibles avant que l'agrégation ait lieu.

Donc, on aura

$$\Delta\Delta G \approx -RT \ln x$$

où x est le rapport molaire $[m_c]/[n_c]$.

L'application de cette dernière relation aux données de la Figure 3.2 nous donne la variation de l'énergie libre de transition de l'état 1 à l'état 2. Cette variation est égale à $-8.34 \text{ kJ mol}^{-1}$ pour le

Mg^{2+} et à -13 kJmol^{-1} pour le Ca^{2+} .

Dans le but de relier la variation $\Delta\Delta G$ à la polarité de l'interface DGDG-eau, nous supposons que les membranes agrégées forment un réseau de liaisons hydrogènes entre les têtes polaires des vésicules en interaction. Comme nous avons vu par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, le groupement COH du noyau de sucre et le pont COC entre l'anomère- α et β sont les sites les plus probables à la formation de ces liaisons (Tableau 3.3). Dans ce cas, l'énergie d'interaction DGDG-DGDG est donnée par l'expression suivante (Starzak, 1984):

$$\Delta\Delta G = - \frac{2\vec{\mu}_j \vec{\mu}_k N_A}{4000\pi\epsilon_r r^3} \quad \text{en kJ mol}^{-1}$$

où

$\vec{\mu}_j$ et $\vec{\mu}_k$ sont, respectivement, les moments dipôlares de COH et de COC.

r : la distance d'approche minimale, c'est-à-dire la distance d'une liaison hydrogène entre deux molécules de DGDG en interaction.

ϵ_r , N_A : Permittivité relative et nombre d'Avogadro, respectivement.

Pour rendre l'expression précédente plus pratique, on remplace tous les paramètres connus par leurs valeurs correspondantes

$$\Delta\Delta G = - \frac{2773 d_j d_k}{\epsilon_r r^3} \quad \text{kJmol}^{-1}$$

où

d_j , d_k sont, respectivement, les longueurs des dipôles (en Angström)

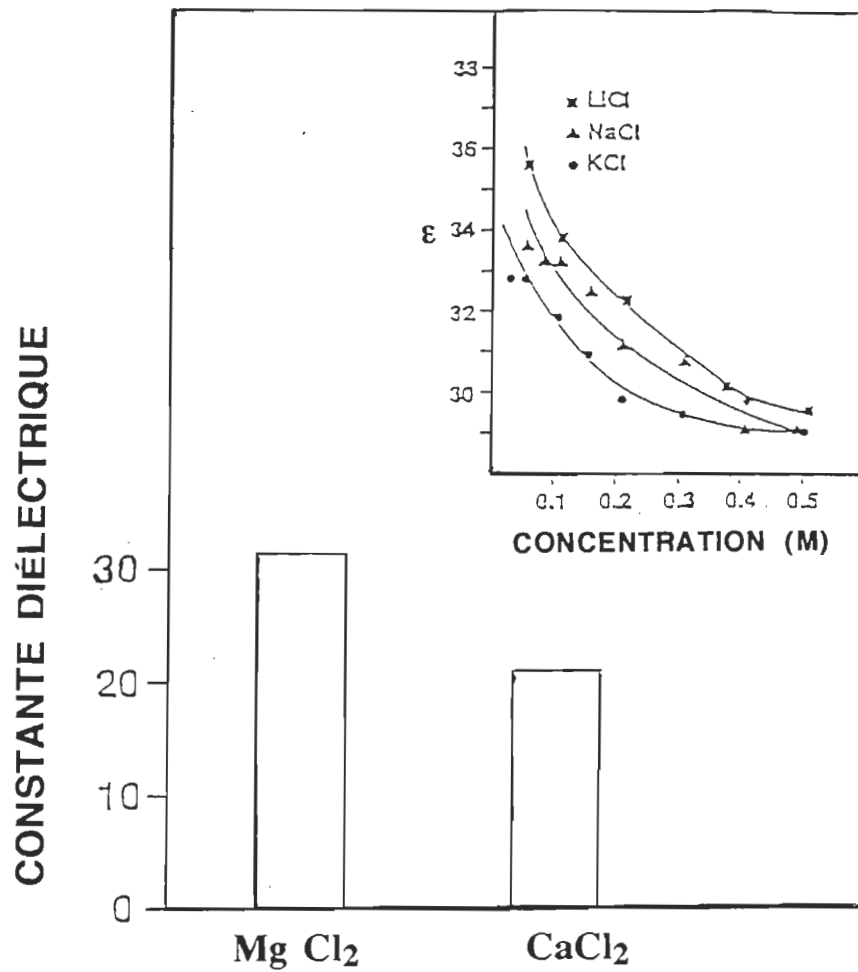


Figure 3.9 Variation de la constante diélectrique à l'interface DGDG-eau en présence de: 18 mM $MgCl_2$, 10 mM $CaCl_2$.
 Figure insérée: variation de la constante diélectrique à l'interface PC-eau en fonction de différentes concentrations de cations monovalents. (Lessard et Fragata, 1986)

des groupements COH et COC

En utilisant $d_j = 0.6 \text{ \AA}$, $d_k = 1.3 \text{ \AA}$, $r = 2 \text{ \AA}$ (Fringeli et Günthard, 1981) et les valeurs de $\Delta\Delta G$ déterminées précédemment

pour Mg^{2+} et Ca^{2+} , c'est-à-dire $-8.34 \text{ kJ mol}^{-1}$ et -13 kJ mol^{-1} , nous trouvons une constante diélectrique égale à 32 pour le Mg^{2+} et à 21 pour le Ca^{2+} (Figure 3.9). Ceci signifie que le Ca^{2+} peut baisser plus efficacement la polarité de l'interface galactolipide-eau que le Mg^{2+} . Ces résultats confirment d'autres travaux concernant l'effet de Li^+ , de N^+ et de K^+ sur la polarité de l'interface des membranes de PC (Lessard et Fragata, 1986). Nous pensons que les cations monovalents et divalents partagent le même mécanisme de contrôle de la polarité de l'interface lipide-eau, et que les cations à large rayon atomique jouent un double rôle. D'une part, ils agrègent efficacement les vésicules lipidiques, et d'autre part, ils provoquent une forte baisse de la constante diélectrique à l'interface lipide-eau.

3.4. Discussion

Sur la base de l'étude spectroscopique des anomères α et β de D-glucosyldiacylglycérol (GIDG), c'est-à-dire $\text{Glc}\alpha\text{-3DAG}$ et $\text{Glc}\beta\text{-3DAG}$, Mannock et al (1987, 1990) ont observé que l'anomère- α présente une seule bande intense à 1730 cm^{-1} attribuée à l'ester libre sn_1 . Par ailleurs, le spectre d'absorption infrarouge de l'anomère- β présente deux bandes distinctes, une à 1737 cm^{-1} et l'autre à 1715 cm^{-1} . Ces bandes ont été respectivement attribuées

aux carbonyles libre sn_1 et lié sn_2 . Le carbonyle lié est la conséquence de la formation d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle deux du sucre et le carbonyle C=O. Cependant des études récentes sur les bicouches hydratées de phospholipides (Blume et al, 1988; Lewis et McElhaney, 1992) montrent que les deux composantes (sn_1 , sn_2) ne sont pas associées à une chaîne en particulier, c'est-à-dire que pour chacune des deux positions, il y a une contribution des groupements C=O liés ou exposés à un milieu polaire et des C=O libres. La différence de fréquence observée expérimentalement entre les deux groupements est dans l'ordre d'une formation d'une liaison hydrogène intermoléculaire (Mushayakarara et al, 1986; Blume et al, 1988). Sur la base de ces résultats les auteurs suggèrent la présence de deux populations de groupement carbonyle ester, l'une lié et l'autre libre.

Dans ce travail, en se basant sur les résultats de la modélisation dans le vide, nous avons montré qu'une liaison hydrogène peut avoir lieu entre le groupement $C_{6\alpha}OH$ de la tête polaire du DGDG et le carbonyle ester sn_2 C=O. En pratique, ce site pourrait probablement entrer en compétition avec d'autres molécules. Par contre, l'ester $^nC=O$ sn_1 serait plutôt libre ou capable d'interagir avec les molécules d'eau.

Sur la base des résultats obtenus en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, nous pensons que l'action des cations Ca^{2+} , Mg^{2+} et Na^+ se limite aux anomères α et β du galactose, et que le site d'interaction le plus probable de ces cations est localisé plus particulièrement au groupement COC de l'anneau de sucre. Cette

attribution provient de la configuration adoptée par la tête polaire de DGDG et de déplacement des fréquences à 1419 et à 1407 cm^{-1} sous l'effet des sels (Tableau 3.2). La conséquence importante de cette interaction est la perturbation totale ou partielle de l'organisation des molécule de l'eau à l'interface lipide-eau. Cet effet a été observé également dans la phosphatidylsérine où l'absorption du Ca^{2+} par le lipide conduit à une déshydratation de sa tête polaire (Gruen et al, 1984; Kozlov et al, 1989).

Comme nous l'avons déjà mentionné (section 3.2.2.b), le groupement carbonyle de l'ester du DGDG ne semble pas affecté par le CaCl_2 , le MgCl_2 , et le NaCl . Néanmoins, ces sels interagissent fortement avec l'ester de phosphatidylglycérol (PG) (Nénonéné, 1992). Cette observation est essentielle à la recherche des mécanismes qui contrôlent la fonction du DGDG dans la membrane des thylacoïdes du chloroplaste. Une question fondamentale se pose: comment les processus d'agrégation des vésicules lipidiques peut avoir lieu? L'agrégation des vésicules du DGDG est stimulée par la présence des ions. En effet, la relation de Born (Israelachvili, 1985) nous permet d'élucider le mécanisme d'interaction lipide-cation. L'énergie de Born ($\Delta\mu$) est donnée par l'expression:

$$\Delta\mu = \frac{-z^2 e^2}{8\pi\epsilon_0 a} \left(\frac{1}{\epsilon_1} - \frac{1}{\epsilon_2} \right)$$

z: valence d'un ion donné

a: rayon des ions

e : charge de l'électron

ϵ_0 : permittivité du vide

ϵ_1 : constante diélectrique à l'interface eau/lipide

ϵ_2 : constante diélectrique loin de l'interface eau/lipide (solvant aqueux).

Le déplacement des ions de l'interface eau-lipide ($\epsilon_1=25-32$; Lessard et Fragata, 1986) vers le solvant ($\epsilon_2=78$) est énergétiquement favorable c'est-à-dire $\Delta\mu$ est entre -27 et -18 kJ mol^{-1} . Cette énergie est située dans le domaine de la plupart des liaisons hydrogènes, soit entre 10 et 40 kJ mol^{-1} (Israelachvili, 1985). Cela veut dire que les ions restent adsorbés à la surface lipidique vraisemblablement par le truchement d'interactions cations-dipôle (COH de la tête polaire) (Vinograd et Linnell, 1971). Il est à noter que ces interactions sont plus fortes que des interactions du type dipôle (molécule d'eau)-dipôle (COH de la tête polaire) d'où l'exclusion des molécules d'eau de l'interface eau-lipide. En outre, la formation d'une liaison hydrogène entre les résidus de galactose a été suggérée (Carpentier et al, 1983). En effet, les données de la diffraction des neutrons (McDaniel, 1988) montrent que la tête polaire du DGDG est située parallèlement au plan de sa bicouche lipidique. Dans cette conformation, les moments dipolaires des quatre groupements COH de la tête polaire pointent vers l'extérieur du plan de la membrane, ce qui facilite leur interaction avec d'autres résidus de galactose et est éventuellement à l'origine de l'agrégation des membranes constituées de DGDG. En réalité, la distribution spatiale et l'orientation moléculaire des groupements hydroxyles du galactose sont à l'origine

de la formation d'un réseau complexe de liaisons hydrogène, soit avec les membranes adjacentes, soit avec les molécules d'eau à l'interface. Malgré le fait qu'aucun mécanisme clair n'a encore été mis au point pour expliquer ce type d'interaction avec l'une ou l'autre des liaisons, Webb et ses collaborateurs (1988) ont tenté d'expliquer les interactions qui se produisent lors de l'interaction ions-galactolipide. En se basant sur le rayon hydraté (R_h) des ions, les auteurs démontrent l'existence d'une relation linéaire entre l'efficacité du cation et R_h . Cette linéarité semble être raisonnable pour les cations monovalents. Cependant, elle doit tenir en compte les forces qui prévalent au niveau de l'interface lipide-eau, là où la constante diélectrique est faible, soit entre 25 et 35 pour des systèmes non agrégés (Lessard et Fragata, 1986), et probablement moins pour les systèmes agrégés (Fragata et al, 1993). Dans le même ordre d'idées, des études récentes (R.Tokay, M.Fragata et G. Ayranci, en préparation) démontrent que l'agrégation des vésicules du DGDG devrait dépendre du rayon atomique des métaux déshydratés, c'est-à-dire l'interaction attractive entre deux vésicules serait reliée à la dimension et à la forme de l'orbitale atomique des métaux.

Une analyse plus poussée demanderait donc des données basées sur le calcul de la distribution de la constante diélectrique à l'interface lipide-eau, afin de rendre compte des forces résultantes de la polarisation. Dans cet esprit, nous avons développé une méthode de calcul de la constante diélectrique à l'interface galactolipide-eau.

Nos résultats montrent que les perturbations produites par le

Ca^{2+} sont plus importantes que celles produites par le Mg^{2+} , et expliquent ainsi pourquoi les vésicules lipidiques du DGDG s'agrègent dans une concentration du Ca^{2+} plus faible que celle du Mg^{2+} .

Le résultat de la turbidité inverse exclut toute fusion possible entre deux vésicules lipidiques constituées de DGDG sous l'effet des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Qualitativement, les sites d'interaction de ces cations dépendent de l'organisation moléculaire de la tête polaire de lipide et de son orientation dans l'espace.

La configuration adoptée par la tête polaire de lipide nous donne une nouvelle base pour expliquer l'agrégation des vésicules du DGDG. C'est dans cet esprit que nous avons mis en pratique un modèle théorique qui décrit la configuration adoptée par la tête polaire de lipide. Dans la configuration trouvée la géométrie adoptée par les groupements hydroxyles de la tête polaire, dont l'affinité envers les molécules d'eau est importante, est à l'origine de la formation d'une couche hydratée dont l'épaisseur dépend du nombre d'unités de galactose (Marra, 1985). Cette couche peut être déstabilisée en présence de cations, suite à une perturbation de la polarité de l'interface lipide-eau, ce qui provoque l'agrégation des vésicules lipidiques du DGDG. Malgré que notre modèle est élaboré dans le vide, c'est-à-dire sans la présence ni des molécules de D_2O ni d'autres molécules de DGDG, il donne des résultats comparables à plusieurs travaux (voir, e.g., Brasseur et al, 1983) sur la surface occupée par la tête polaire de lipide et procure une somme de renseignements sur le processus d'agrégation, sans fusion, des vésicules lipidiques. Nous devons, toutefois ajouter que ce modèle ne représente pas la réalité

absolue. La liaison hydrogène entre le carbonyl ester sn_2 et le groupement hydroxyle de carbone-6 de l'anomère- α peut ne pas avoir lieu à cause des molécules d'eau lourde qui entrent en compétition avec la liaison hydrogène en question. Et la baisse de fréquence observée de groupement sn_2 , le plus près de la tête polaire et dont l'environnement est beaucoup plus polaire, pourrait être le résultat de formation d'une liaison intermoléculaire entre le carbonyl ester et les molécules d'eau lourde. Par ailleurs, la composante à haute fréquence serait attribuable au groupement carbonyl ester sn_1 le plus éloigné de la tête polaire car ce groupement est situé plus profondément dans la région hydrocarbonée avec un environnement plus hydrophobe. La différence de fréquence de vibration observée pour ces groupements carbonyle serait donc due aux différents degrés d'hydratation et aux différents environnements.

CHAPITRE IV

INTERACTION LIPIDE-PHOTOSYSTEME II

4.1. Introduction

4.1.1 Organisation moléculaire du PSII

Le photosystème II contient près d'une vingtaine de polypeptides différents, des pigments, des chlorophylles, des phéophytines, des caroténoïdes, des quinones, des lipides et des ions organiques. Ces constituants de PSII sont organisés sous forme de complexes capteurs de lumière, d'une chaîne de transfert d'électrons, et d'un système enzymatique d'oxydation de l'eau localisé dans la face interne de la membrane thylacoïdale (Hansson et Wydrzynski, 1990).

Brièvement, le "core" complexe du PSII (Figure 4.1) comporte une cinquantaine de molécules de chlorophylle associées aux polypeptides de 47 et 43 kD (Camm et Green, 1980). Le polypeptide de 47 kD a un rôle dans l'ancrage du polypeptide de 33 kD à la membrane (Bricker et al, 1988), alors que la protéine de 43 kD porte les pigments collecteurs de lumière et servirait de collecteur de lumière interne en plus de LHCII (Camm et Green, 1983; Nakatani et al, 1984). Par ailleurs, le polypeptide de 32 kD est lié à l'accepteur secondaire Q_B (Barber, 1987), tandis que le polypeptide de 34 kD contient les

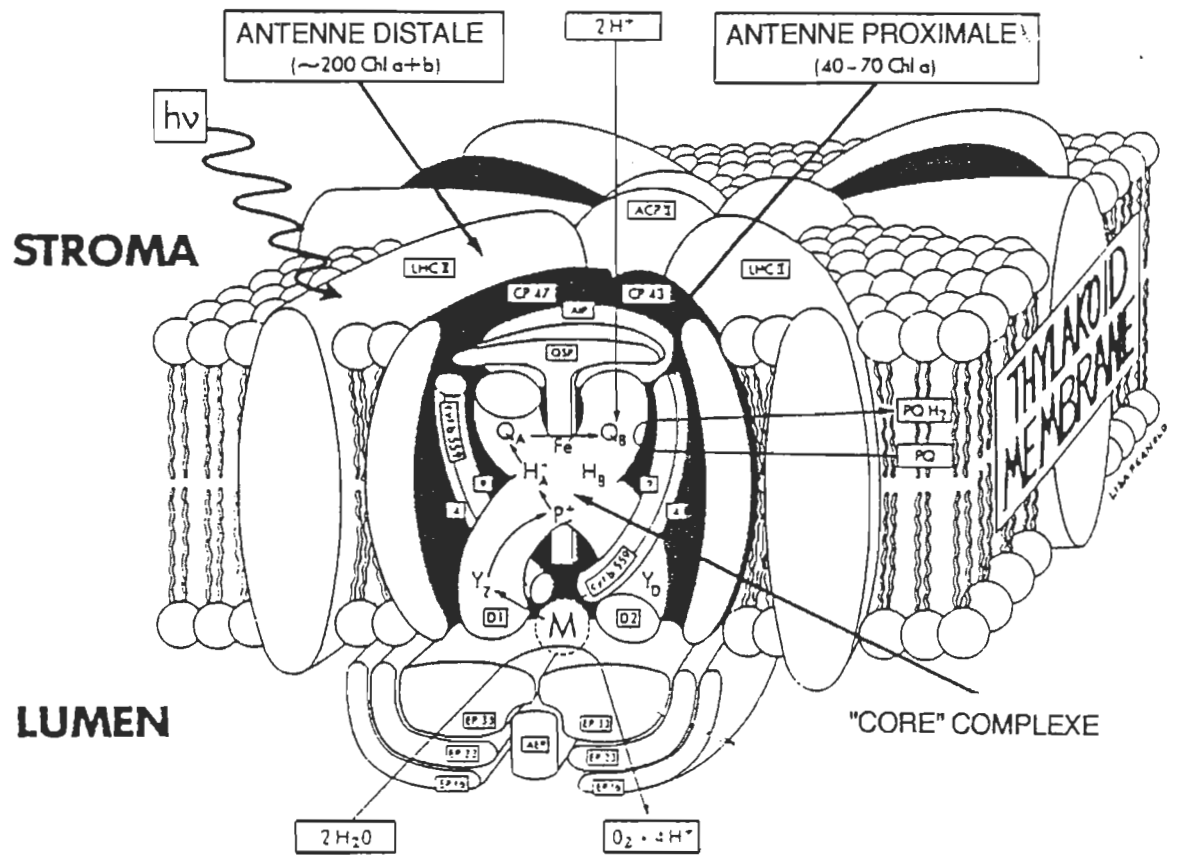


Figure 4.1. Représentation schématique du centre réactionnel du PSII (Hansson et Wydrzynski, 1990).

atomes de manganèse impliqués dans l'oxydation séquentielle de l'eau (Cheniae, 1980; Cammarata et al, 1984) et sert de site de fixation à la quinone Q_A.

À côté de ces polypeptides de "core" complexe, il existe le cytochrome b-559 sous forme de dimère de poids moléculaire 4.5 kD et 9 kD (Widger et al, 1985). Le rôle ou les rôles de cytb-559 reste aujourd'hui la plus grande énigme du PSII. Son rôle dans le processus du dégagement d'oxygène est un sujet controversé (Ortega et al, 1989; Thompson et Brudwing, 1988). L'idée la plus répandue actuellement est l'implication du cytb-559 dans le transport cyclique d'électrons autour du PSII (Bendall, 1982; Andréasson et Vanngard, 1988).

Sur la face luménale de la membrane granaire, il existe trois polypeptides extrinsèques de 33, de 23 et de 18 kD présents en quantités égales et ayant un rôle mal connu dans le processus de l'activité photosynthétique (Yocum, 1991). La présence de ces polypeptides favorise énormément le dégagement d'oxygène, mais l'activité photosynthétique de PSII peut être restaurée partiellement en absence de ces polypeptides par des concentrations appropriées d'ions chlore et calcium (Homann, 1987; Govindjee et Coleman, 1985; Miyao et Inoue, 1991).

4.1.2. Interaction lipides-protéines dans le PSII

Les interactions lipides-protéines dans des membranes reconstituées forment un domaine particulièrement capital à l'étude

de l'architecture moléculaire de la membrane biologique.

Nous savions depuis longtemps que l'activité enzymatique de certaines protéines dépend de façon absolue de leur association avec les lipides (Letterier et Marie, 1989) et que la distribution des protéines dans les membranes et leurs modes d'associations en présence des lipides revêtent une importance physiologique fondamentale.

Quoiqu'il en soit, l'effet des lipides sur le recouvrement de l'activité photosynthétique a fait l'objet d'un nombre croissant d'études. Dans les travaux d'Akabori et al (1984), on s'aperçoit que l'activité des membranes initialement délipidées peut se rétablir par l'inclusion de lipides dans la membrane photosynthétique. En outre, Gounaris et al (1983) ont montré que les lipides de la membrane photosynthétique jouent un rôle primordial dans l'activité du dégagement d'oxygène. Cette activité dépend du type de lipide et du degré d'insaturation de sa chaîne hydrocarbonée.

Les travaux de Jordon et de ses collaborateurs (1983) ont également démontré que la déplétion de la membrane des thylacoïdes des phospholipides provoque une inhibition du transport d'électrons et altère la distance entre la phéophytine et la quinone Q_A .

Des expériences récentes (Fragata et al, 1991) sur des membranes reconstituées du PSII indiquent que le PG stimule l'activité du dégagement d'oxygène. Cependant, Siegenthaler et son groupe (1989) trouvent que l'élimination de PG et de PC de la monocouche externe de la membrane des thylacoïdes par la

phospholipase A2 n'affecte en aucun cas le transfert linéaire d'électrons de l' H_2O au NADP^+ . Néanmoins, les travaux de Gounaris et al (1983), de Butler et Matsuda (1983) sur les membranes reconstituées du PSII indiquent que le DGDG et le PC peuvent stimuler l'activité du dégagement d'oxygène tandis que le MGDG n'a aucun effet sur ce dernier. D'autre part, la diminution de la concentration de Mg^{2+} , voir son absence, entraînerait la dissociation du complexe Chla/b LHC du centre réactionnel du PSII, avec pour conséquence la baisse de l'activité du PSII (Melis et Ow, 1982).

Dans le but de comprendre le rôle et la fonction du DGDG, un lipide non-ionique, dans la membrane des thylacoïdes, nous avons préparé des membranes reconstituées avec des polypeptides du PSII et des vésicules de DGDG afin d'étudier l'effet du lipide et des sels sur l'activité du dégagement d'oxygène. Les mécanismes qui sont à l'origine des effets de DGDG et de MgCl_2 sur l'activité photosynthétique ne sont pas bien connus. Pour étudier les modifications structurales et conformationnelles qui interviennent au niveau des membranes photosynthétiques, plusieurs techniques spectroscopiques ont été utilisées, parmi autres: résonance magnétique nucléaire, résonance Raman, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. C'est cette dernière technique que nous allons utiliser pour analyser les interactions moléculaires qui se produisent dans les liaisons peptidiques lors de la reconstitution du complexe PSII-DGDG en absence et en présence des sels.

4.1.3. Étude par spectroscopie infrarouge

4.1.3.a. Modes vibrationnels des liaisons peptidiques

En raison de la délocalisation électronique de la liaison peptidique les atomes du groupement CONH se trouvent presque dans le même plan. L'orientation tridimensionnelle de cette liaison (Figure 4.2) sera alors déterminée uniquement par les angles de rotation ψ et ϕ au niveau du groupement méthylène CHR. Ces liaisons peptidiques donnent naissance à différents modes de vibration, tels l'amide I, l'amide II et l'amide III. Il existe aussi deux modes de vibration (amide A et B) provenant de la résonance Fermi entre le mode d'étirement du groupement N-H et la deuxième harmonique de l'amide II (Tu, 1982). Plus spécifiquement la bande principale de l'amide I, située approximativement entre 1600 et 1700 cm^{-1} (Alvarez et al, 1987) provient de la vibration d'élongation C=O (C=Os; voir liste des abréviations) avec une faible contribution de mode de déformation dans le plan N-H (N-Hib; voir liste des abréviations). L'échange des atomes d'hydrogène avec le deutérium n'affecte pas de façon significative la fréquence d'absorption de cette bande. Par contre, la bande amide II qui est située entre 1567-1545 cm^{-1} (Krimm et Bandekar, 1986), provient essentiellement du mode de déformation de N-Hib, couplé à un étirement N-Cs, accompagné d'une faible participation de la déformation C-Oib et d'étirement de C-Cs. En raison de la grande contribution du groupement N-H, l'échange des atomes d'hydrogène avec le deutérium modifie la fréquence de vibration de l'amide II (Chapados et al, 1991) et déplace la fréquence de la bande d'absorption de N-Hib à 1040-940 cm^{-1} et celle de C-Ns

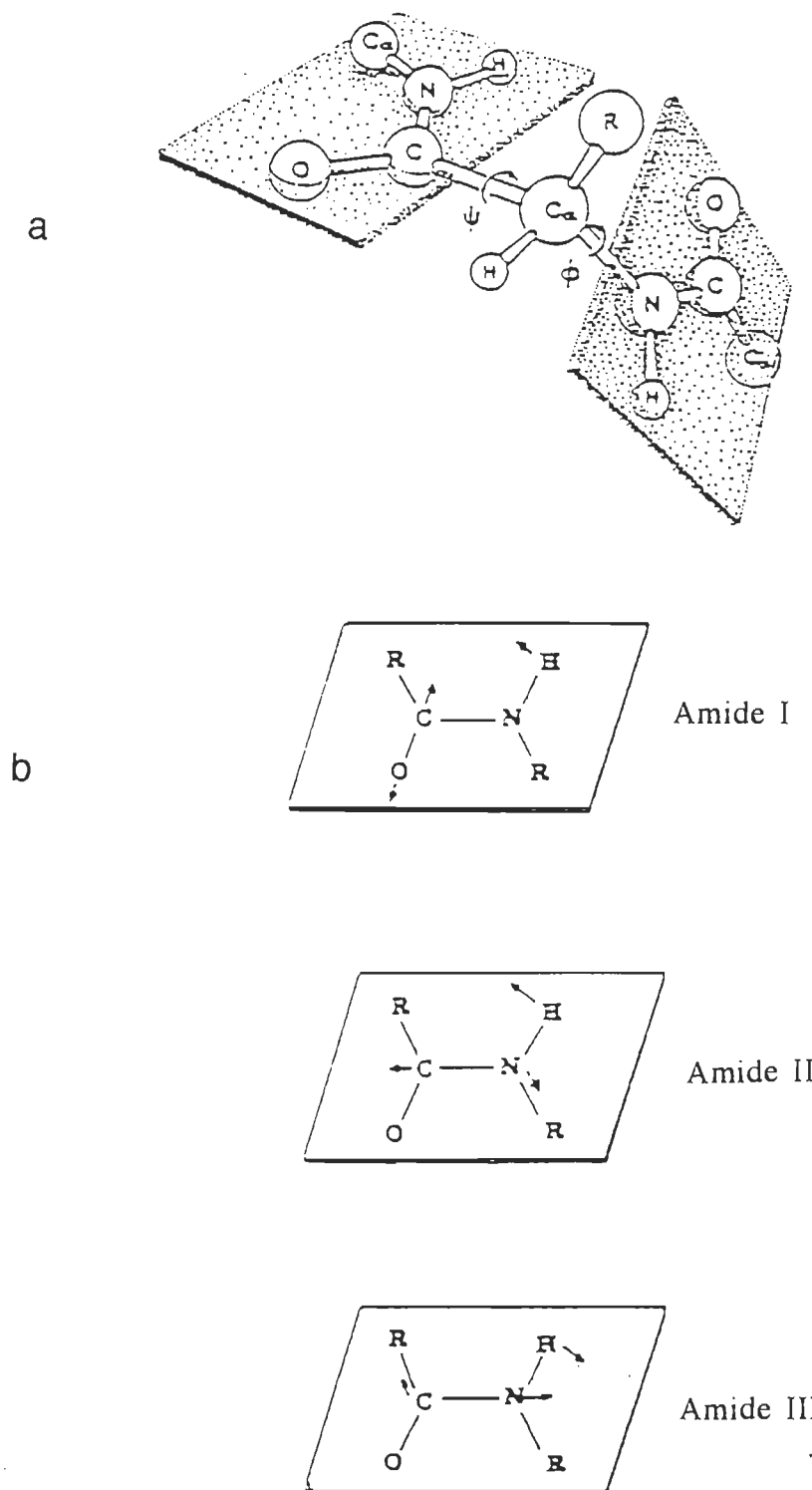


Figure 4.2 Orientation spatiale de la liaison peptidique (a) et modes de vibration d'amide (b). (Tu, 1982)

à $1490\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$ (Krimm et Bandekar, 1986). La bande d'absorption de l'amide III est située dans la région $1305\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$. Cette bande est généralement affectée par la nature des chaînes terminales des acides aminés (Bandekar, 1992), son mode de vibration provient de déformation dans le plan de liaison N-H et d'une faible contribution de vibration d'élongation C-Ns. Il est important de mentionner que cette bande est difficile à identifier par la spectroscopie à transformée de Fourier à cause, d'une part de sa faible intensité et d'autre part de la présence de plusieurs bandes d'absorption dans cette région (Bellamy, 1975).

Dans les différents modes d'enroulement qui définissent la structure secondaire des protéines, la disposition hélicoïdale est souvent favorisée, surtout pour celles qui traversent la bicouche phospholipidique (Richardson et Richardson, 1989; Letterier et Marie, 1989). Il existe également la structure en feuillet- β qui forme une liaison hydrogène entre les groupements $>\text{C}=\text{O}$ et $>\text{N-H}$ et aussi la structure en coude- β qui se replie sur elle même (Tu, 1982).

4.1.3.b. Modes vibrationnels du PSII

Dans la région spectrale $1400\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ (Figure 4.3), on note la présence de quelques faibles bandes de Chl et des galactolipides situées à 1400 cm^{-1} , à 1346 cm^{-1} , à 1287 cm^{-1} et à 1186 cm^{-1} (Berthomieu et al, 1992; Chapados et al, 1991; Allakhverdiev et al, 1994). Dans la région $1780\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$ le carbonyle de la chlorophylle (deux esters et une cétone par molécule) vibre approximativement

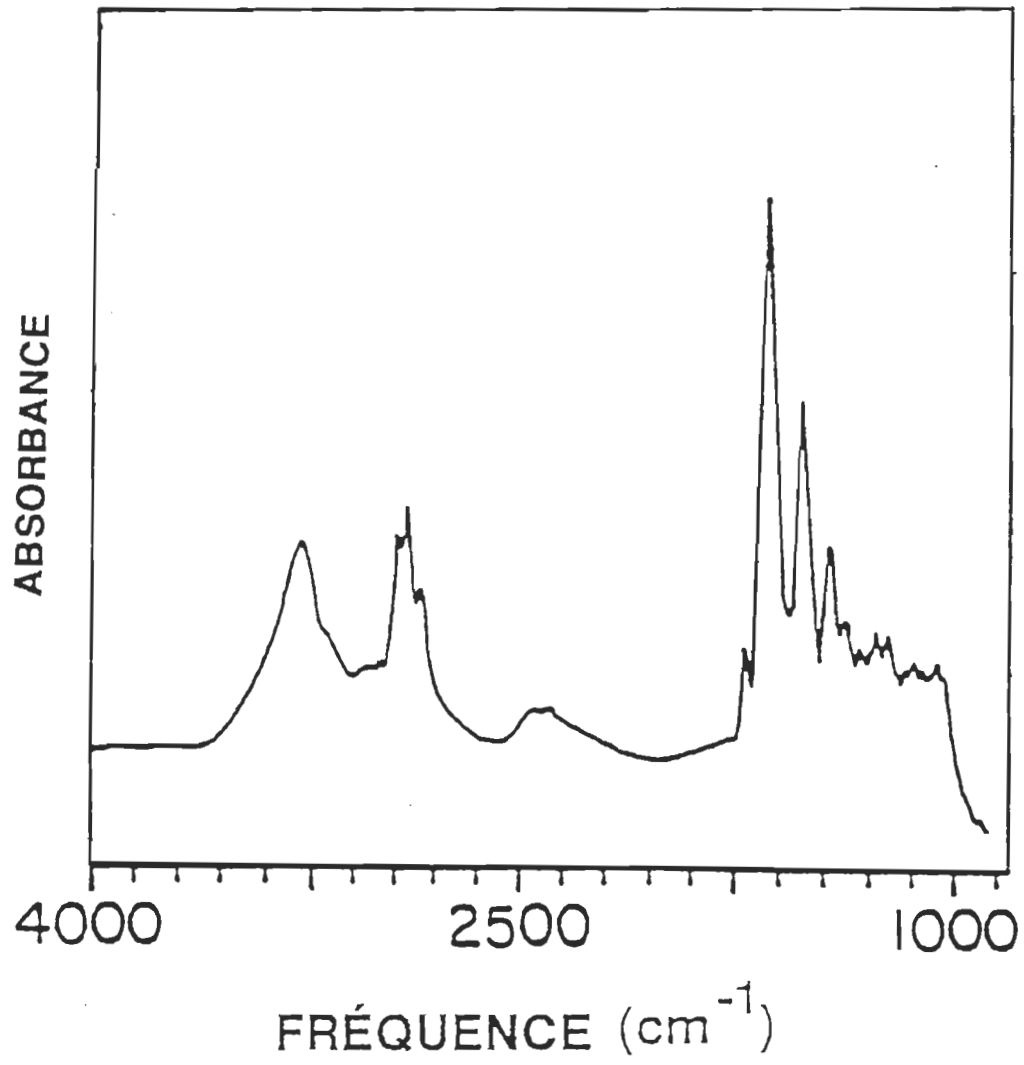


Figure 4.3 Spectre d'absorption ir des membranes de PSII
(voir section 2.2.2)

à la même fréquence que celle des protéines (peptides et chaînes terminales des acides aminés) et des lipides autour de 1736 cm^{-1} (Nabedryk et al, 1992, 1993; Morita et al, 1993; Chapados et al, 1986). La bande vibrationnelle du lipide à 1736 cm^{-1} étant plus importante en intensité et présentant une bande beaucoup plus large, englobe les bandes de la Chl et des protéines (Tavitian et al, 1986). Dans la région $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ on note une bande à forte intensité de l'amide I située près de 1656 cm^{-1} (He et al, 1991) et quelques bandes des cétones libres de Chl autour de 1700 cm^{-1} et 1687 cm^{-1} (Fujiwara et Tasumi, 1986; Leonhard et al, 1990; Tavitian et al, 1986). La fréquence de la bande amide I indique que le PSII est riche en structure secondaire en hélice- α (Byler et Susi, 1986; Tajmir-Riahi et Ahmed, 1993). Dans la région $1567\text{-}1545\text{ cm}^{-1}$ on trouve la bande amide II, dont l'intensité est importante en spectroscopie infrarouge et faible en spectroscopie Raman, autour de 1556 cm^{-1} . En présence de D_2O cette bande se sépare en deux, une est située vers 1547 cm^{-1} et l'autre vers 1453 cm^{-1} (Chapados et al, 1991). Près de cette région on aperçoit également les bandes d'absorption des groupements $\text{C}=\text{C}$ et $\text{C}=\text{N}$ autour de 1600 cm^{-1} de chlorophylle, de galactolipide et de carotène (Nabedryk et al, 1990; Lutz, 1984; Chapados et al, 1990). Le mode d'élongation $\text{C}-\text{O}$ de tyrosine est situé à 1517 cm^{-1} (MacDonald et Barry, 1992; Chirgadze et al, 1975, Kennedy et al, 1990).

Dans la région d'élongation entre $3700\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$, nous observons la bande de vibration symétrique de l'amide A qui vibre à 3300 cm^{-1} dans les thylacoïdes entiers (Nénonéné, 1992). Ce mode de

vibration dépend étroitement de la liaison hydrogène N-H...O=C. Bien que ce mode vibrationnel est très localisé c'est-à-dire peu sensible au changement conformationnel des polypeptides, son déplacement peut être une indication d'une modification structurale des protéines (Doyle et al, 1975). Dans cette région on peut noter également d'autres bandes de vibration des groupements O-H, CH₂ et CH₃ des lipides et de Chl (Chapados, 1985).

4.2. Résultats expérimentaux

4.2.1. Effets du DGDG et du MgCl₂ sur l'activité du PS II.

L'activité photosynthétique des particules de PSII incubées avec les vésicules du DGDG est étudiée en mesurant le dégagement d'oxygène. Nous avons observé que le DGDG stimule l'activité de la production d'oxygène dans les particules de PSII. Cette activité est strictement liée au rapport lipide/Chl. Elle est importante lorsque le rapport lipide/Chl (poids/poids) est égal 5, et elle diminue quand la concentration du DGDG augmente (Figure 4.4). Cette observation corrobore partiellement les données de Gounaris et al (1983), bien que leur expériences aient été faites avec des lipides ioniques (PG+SQDG). Ces auteurs ont observé une inhibition significative du dégagement d'oxygène avec des préparations de PSII incubées avec PG+SQDG pour un rapport lipide/Chl de 14/1 (p/p). N'ayant pas la preuve de perte de polypeptides dans notre cas présent, nous postulons que la diminution de l'activité photosynthétique observée

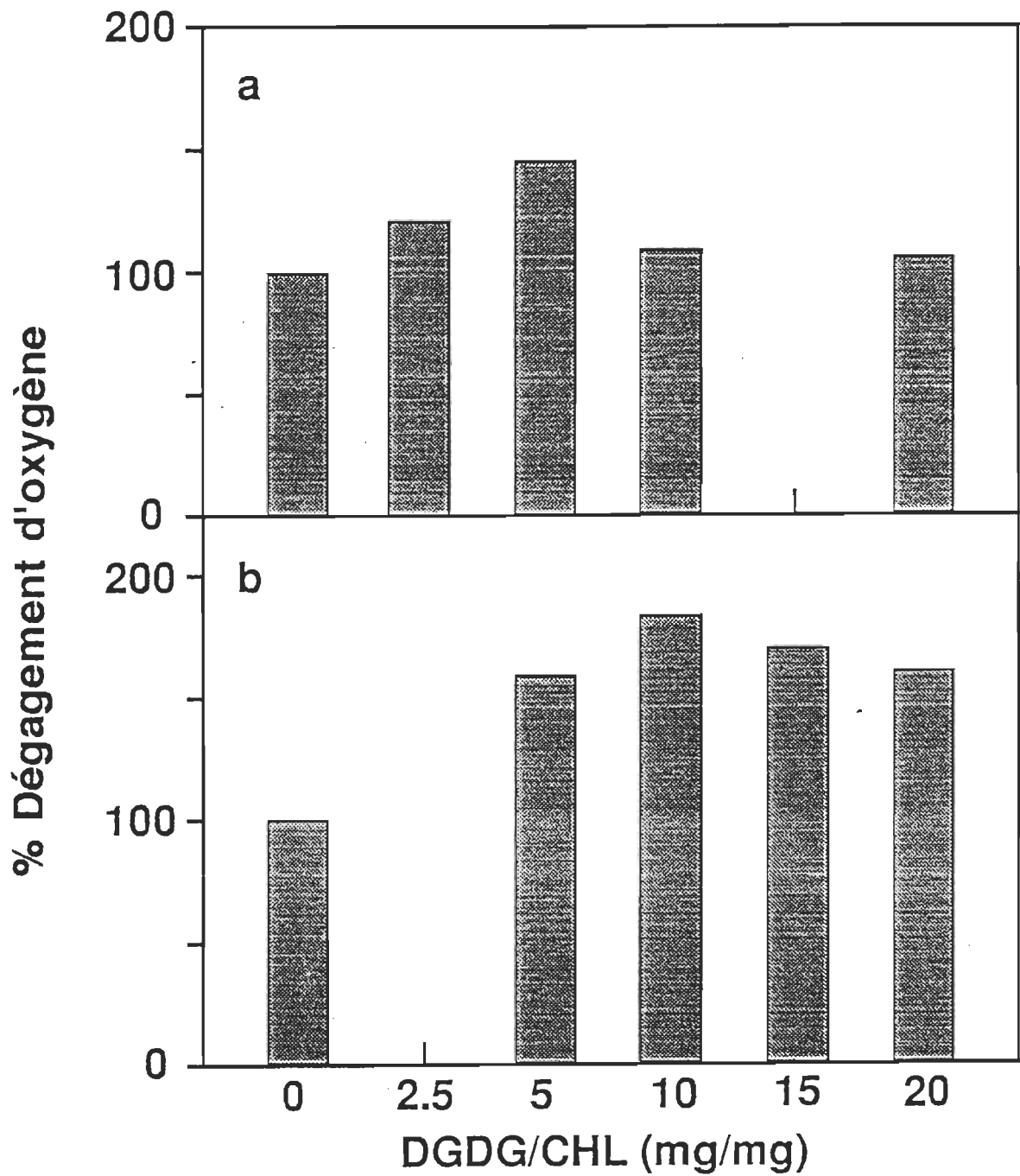


Figure 4.4 Diagramme représentant l'effet du DGDG sur le dégagement d'oxygène des particules de PSII et du complexe PSII-DGDG (a) Sans sel; (b) 10 mM MgCl₂

est due à la perte de la coopération entre les unités du PSII (Mc Donnel et Staehelin, 1980). Malgré le fait que les mécanismes qui sont à l'origine de l'effet stimulateur du DGDG ne soient pas encore clairs, nous pensons que la distribution préférentielle de ce lipide dans la face interne (i) de la membrane, près des polypeptides de dégagement d'oxygène, par rapport à la face externe (e), i.e., $i/e=85/15$ (Rawyler et al, 1987) est l'un des principaux facteurs qui contrôlent la forte stimulation de l'activité photosynthétique. Une autre explication possible serait la modification structurale des polypeptides du dégagement d'oxygène dans un environnement galactolipidique qui favoriserait leurs activités enzymatiques.

En présence de 10 mM $MgCl_2$ dans le milieu d'incubation, deux points majeurs se dégagent. On observe d'abord une stimulation beaucoup plus importante du dégagement d'oxygène, avec un maximum autour de 10 (p/p) de rapport DGDG/Chl. Ensuite, pour de forte teneur de DGDG dans le complexe PSII-DGDG, l'activité décroît d'une façon moins importante que précédemment. L'addition donc de magnésium au milieu d'incubation peut contrecarrer en partie l'effet de la dilution provoqué par la forte concentration du DGDG. Le $MgCl_2$ devrait affecter le site catalytique du complexe de dégagement d'oxygène, ou du moins son environnement. Le lipide ne protège pas complètement ce site au niveau des membranes de PSII. Pour le même rapport lipide/Chl le DGDG stimule plus efficacement le dégagement d'oxygène dans les particules de PSII que le PG, même en présence de 10 mM de $MgCl_2$ (Fragata et al, 1994).

En résumé, la stimulation de l'activité du dégagement

d'oxygène du PSII-DGDG dépend (1) du rapport lipide/Chl, et (2) de la concentration des cations divalents dans le milieu environnant. Il serait intéressant de noter que les expériences de cette partie, effectuées en triplicate, révèlent la bonne reproductibilité de nos résultats. Le plus grand écart observé dans cette partie est de 5%. Pour éclaircir davantage la Figure 4.4 nous devons mentionner que la valeur du dégagement d'oxygène du PSII (sans le lipide) a été prise comme étant le 100%, alors que les autres pourcentages ont été calculés par la règle de trois, et ceci pour tous les échantillons du complexe PSII-DGDG.

4.2.2. Modes vibrationnels du PSII et du complexe PSII-DGDG en absence et en présence des sels

4.2.2.a. Modes vibrationnels du PSII

Le spectre FTIR obtenu pour le PSII pur (Figure 4.5a) est similaire à celui rapporté antérieurement (Allakhverdiev et al, 1994). En bref, la région communément utilisée pour l'étude des protéines, $1800-1000\text{ cm}^{-1}$ (Gerwert et al, 1988) est principalement caractérisée par deux bandes importantes d'absorption, une centrée à 1658 cm^{-1} (bande amide I) et l'autre à 1547 cm^{-1} (bande amide II). Ces deux bandes sont constituées de plusieurs bandes secondaires caractérisant chacune une structure secondaire spécifique de la protéine. Dans la bande amide II on observe un épaulement situé à 1515 cm^{-1} (Berthomieu et al, 1992) attribué à la tyrosine suivi d'une bande à moyenne intensité à 1451 cm^{-1} de mode de déformation C-H

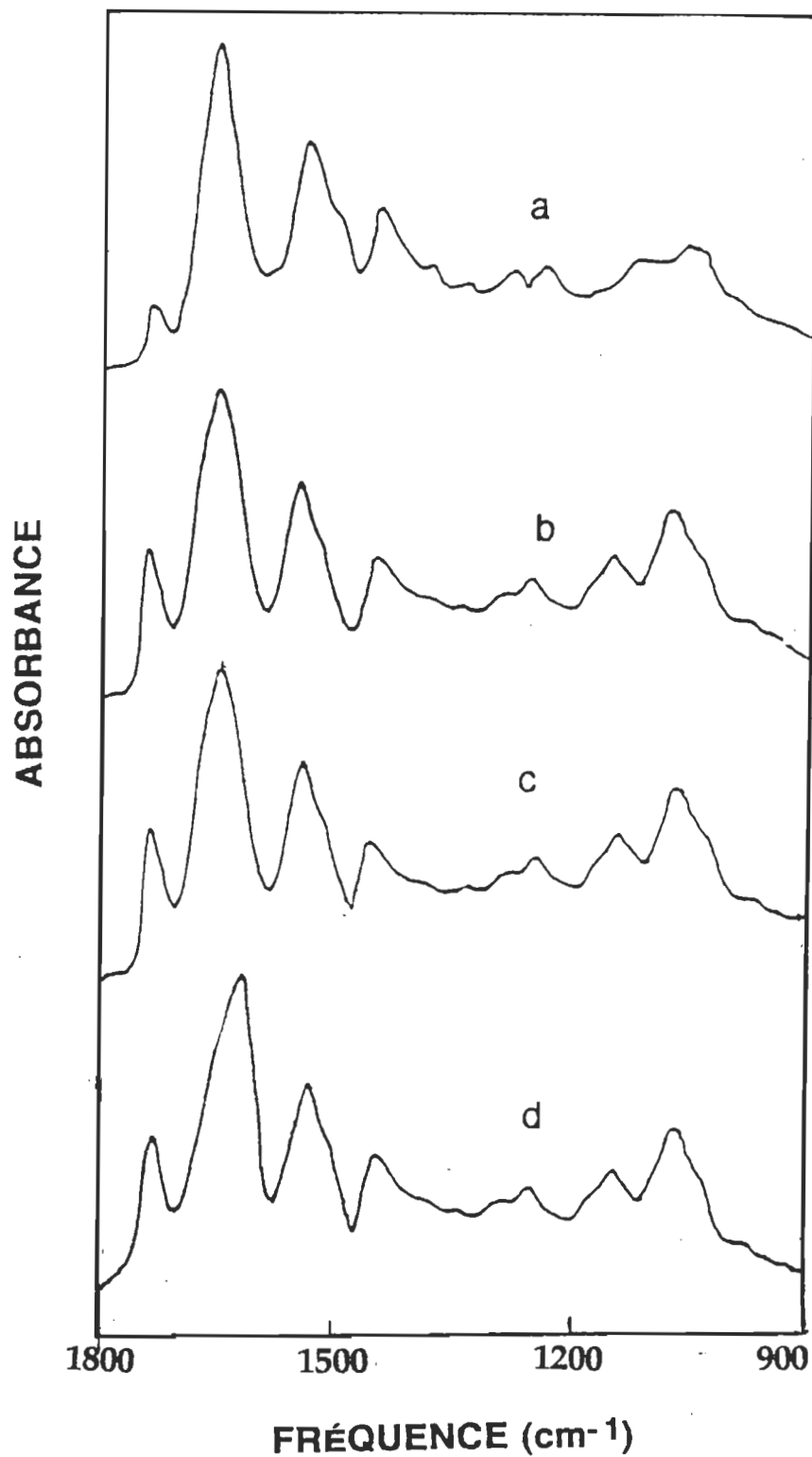


Figure 4.5 Spectres d'absorption ir entre 1800-900 cm^{-1} des polypeptides du PSII et du complexe PSII-DGDG dans le D_2O . (a) PSII; (b) PSII+DGDG; (c) PSII+DGDG+4 mM MgCl_2 ; (d) PSII+DGDG+12 mM MgCl_2 . Le spectre du D_2O a été soustrait tel qu'indiqué dans la section 2.3.1.b.

(Allakhverdiev et al, 1994; Chapados et al, 1990). Dans la région qui s'étale entre 1350-1240 cm^{-1} on trouve la bande amide III à 1249.2 cm^{-1} et quelques faibles bandes à 1345.6 cm^{-1} et à 1288 cm^{-1} de la Chl (Chapados, 1991; Doyle et al, 1975). De plus, on observe la présence de la bande carbonyl ester à 1736 cm^{-1} de Chl, des lipides et des chaînes terminales des acides aminés.

4.2.2.b. Modes vibrationnels du complexe PSII-DGDG

Tout d'abord, il faut signaler que la bande carbonyl ester de DGDG est située à 1741 cm^{-1} (voir section 3.2.2.a.4) mais lors de complexation des particules du PSII avec le DGDG nous ne l'avons pas observé. Ceci semble dû au chevauchement des bandes carbonyl ester de la Chl et des protéines vu que les molécules de chlorophylle ne doivent pas interagir directement avec le DGDG car elles se trouvent à l'intérieur des complexe pigments-protéines. De plus, le groupement carbonyl ester du complexe PSII-DGDG subit un faible déplacement vers les hautes fréquences de 1.5 cm^{-1} (Tableaux, 4.1, 4.2 et Figures 4.5, 4.6), ce qui exclut toute interaction forte entre le lipide et les protéines ainsi que la Chl au niveau de ce groupement. Par contre la bande amide I subit un faible déplacement de 1.4 cm^{-1} vers les basses fréquences ce qui pourrait être une interaction lipide-protéines au niveau de ce groupement (l'analyse détaillée de cette région sera faite dans la section 4.3). Il n'y aurait pratiquement aucun déplacement de fréquence de l'amide II. Il en est de même pour les groupements CH et CH_3 , situés respectivement à 1451 cm^{-1} et à

Tableau 4.1 Effet de différentes concentrations de CaCl_2 sur les polypeptides du complexe PSII-DGDG étudié par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

Attribution des bandes	PSII	PSII-DGDG		
		CaCl_2		
		0 mM	4 mM	12 mM
Carbonyle	1736.0	1737.5	1738.7	1739.4
Amide I	1658.0	1656.6	1654.6	1648.8
Amide II	1547.0	1546.7	1544.7	1542.5
Tyrosine	1515.0	1515.7	1516.7	1516.2
Déformation CH	1451.0	1452.0	1450.2	1450.4
Déformation CH ₃	1345.6 1288.0	1346.0 1286.0	1345.0 1286.0	1346.0 1287.0
Amide III	1249.2	1245.8	1243.8	1244.7

Tableau 4.2 Effet de différentes concentrations de MgCl_2 sur les polypeptides du complexe PSII-DGDG étudié par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

Attribution des bandes	PSII	PSII-DGDG		
		MgCl_2		
		0 mM	4 mM	12 mM
Carbonyle	1736.0	1737.5	1739	1739.6
Amide I	1658.0	1656.6	1653.2	1648.2
Amide II	1547.0	1546.7	1544.0	1542.0
Tyrosine	1515.0	1515.7	1516.6	1516.4
Déformation CH	1451.0	1452.0	1450.4	1450.6
Déformation CH ₃	1345.6 1288.0	1346.0 1286.0	1346.0 1286.0	1346.0 1287.0
Amide III	1249.2	1245.8	1242.7	1242.3

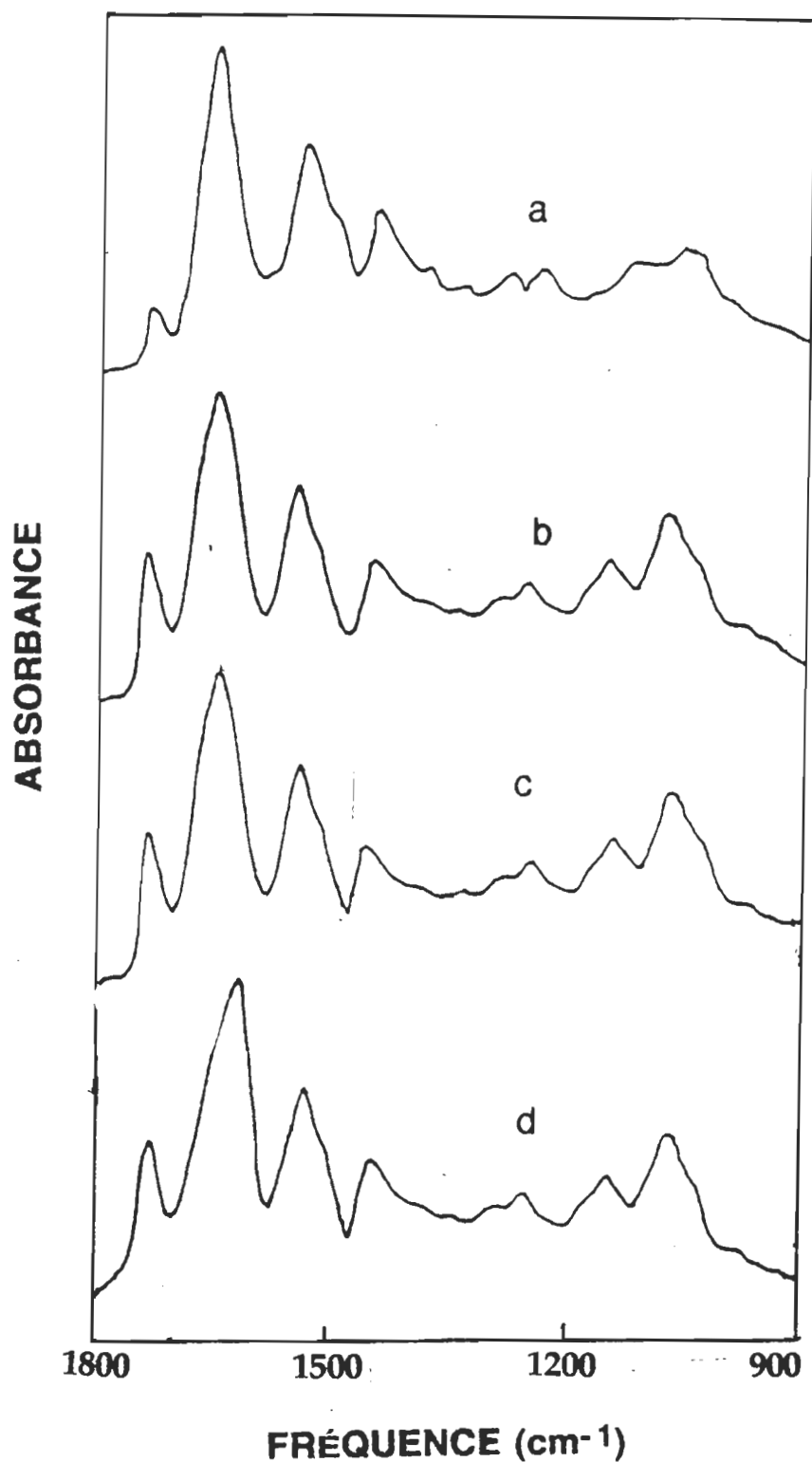


Figure 4.6 Spectres d'absorption ir entre 1800-900 cm⁻¹ des polypeptides du PSII et du complexe PSII-DGDG dans le D₂O. (a) PSII; (b) PSII+DGDG; (c) PSII+DGDG+4 mM CaCl₂; (d) PSII+DGDG+12 mM CaCl₂.

Le spectre du D₂O a été soustrait tel qu'indiqué dans la section 2.3.1.b.

1345.6 cm^{-1} , dont l'attribution est difficile à cause de l'absorption de plusieurs molécules de PSII dans cette région. L'amide III qui est un mode de vibration important en spectroscopie Raman, est pratiquement inexistant en infrarouge, on peut néanmoins deviner une bande à 1249.2 cm^{-1} (Genzel et al, 1984) qui semble se déplacer vers les basses fréquences en présence du DGDG. Le manque d'une résolution convenable de cette bande, ainsi que le chevauchement des bandes d'absorption de plusieurs espèces moléculaires du PSII dans cette région rendent l'attribution de ce déplacement de la bande amide III incertain.

4.2.2.c. Effets des sels sur les modes vibrationnels du complexe PSII-DGDG

Les tableaux 4.1 et 4.2 montrent l'effet du MgCl_2 et du CaCl_2 sur les fréquences des différents modes de vibration du complexe PSII-DGDG. Dans la région 1800-900 cm^{-1} on note un déplacement vers les hautes fréquences de groupement carbonyle ester, de 1.9 cm^{-1} en présence de 12 mM CaCl_2 et de 2.1 cm^{-1} en présence de 12 mM MgCl_2 , des lipides et de Chl ainsi que des chaînes terminales des résidus d'acides aminés. Le déplacement de ce groupement ne peut être attribué avec précision à un type donné des molécules. Cependant, notre étude sur l'interaction cations-DGDG présentée dans la section 3.2.2.b ne révèle aucun décalage de fréquence de groupement ester du DGDG sous l'effet des sels. L'hypothèse d'une interaction cations-Chl ou cations-protéines est de plus en plus plausible.

Par ailleurs, le déplacement vers les basses fréquences de la bande amide I de 8.4 cm^{-1} et de l'amide II de 4.7 cm^{-1} sous l'effet de 12 mM de MgCl_2 , suggère que les cations seraient probablement liés au groupement carbonyle ester de la protéine, en affaiblissant les liaisons hydrogènes existantes, et par conséquent, les polypeptides subiraient des modifications structurales, qui peuvent être interprétées en terme d'une augmentation des structures- β aux dépens de l'hélice- α . Un phénomène semblable a été rapporté par d'autres chercheurs (Surewicz et al, 1987; Parker, 1983) dans le spectre de protéines dénaturées par un gradient de pH ou par la température. Ces résultats sont en accord également avec les travaux de Glaeser et al (1991) qui démontrent que les déplacements des bandes amide I et II indiquent un changement conformationnel de la structure secondaire des protéines. Les fréquences des bandes de CH_2 et de CH_3 restent pratiquement stables lorsqu'on augmente la concentration de Ca^{2+} ou de Mg^{2+} .

4.3. Simulation des spectres infrarouge dans la région amide I

La bande amide I est particulièrement intéressante à l'étude de la conformation structurale des protéines. À cause de sa grande sensibilité (Byler et Susi, 1986) la bande amide I est généralement utilisée pour étudier la conformation des protéines, et ceci malgré quelques tentatives visant à mettre en pratique d'autres modes de vibration en particulier la bande de l'amide II (Surewicz et Mantsch,

1988). De plus, contrairement à ce qui se produit avec la bande de l'amide II, les chaînes terminales des acides aminés n'affectent pas la bande de l'amide I (Bellamy, 1975).

La structure fine de la bande de l'amide I ne peut être déterminée que par la résolution de son spectre original. Dans ce contexte différentes techniques ont été utilisées pour décomposer l'enveloppe de la bande de l'amide I en ses composantes primitives, entre autres la dérivée seconde (Dong et al, 1992), la déconvolution spectrale (Surewicz et al, 1987), l'analyse par la méthode des moindres carrées (Dousseau et Pézolet, 1990), la simulation spectrale (Surewicz et al, 1987), etc..

Il a été souvent reconnu que la méthode de la simulation spectrale est une de plus efficaces dans l'estimation des pourcentages relatifs des différentes structures (hélice- α , feuillet- β et coude- β) de la bande amide I (voir Byler et Susi, 1986).

Dans ce travail, deux techniques différentes ont été utilisées pour décomposer la bande de l'amide I en ses composantes primitives: la dérivée seconde et la simulation spectrale. Par la première technique, nous avons pu identifier six bandes dans la région 1700-1590 cm^{-1} , dont l'attribution est basé sur des études antérieures des protéines à structure secondaire déjà connue, alors que par la seconde technique nous avons déterminé la présence de neuf bandes et les pourcentages des sous-structures secondaires.

Notre objectif est de quantifier les différences dans la région de l'amide I du PSII et du complexe PSII-DGDG en absence et en

présence des cations Mg^{2+} et Ca^{2+} . Pour ce faire, nous avons utilisé les fréquences des bandes d'absorption qui ont été identifiées par la technique de la 2^{ième} dérivée pour localiser le maximum des bandes constituant l'enveloppe totale de l'amide I. La fréquence de la bande située à 1695.4 cm^{-1} et de deux demi-bandes extrêmes situées à 1709.8 cm^{-1} et à 1591.9 cm^{-1} ont été ajoutées, si nécessaire, dans le but d'avoir une bonne reproduction de l'enveloppe originale. Les intensités des pics ainsi que les largeurs à mi-hauteur des sous bandes ont été ajustées par ordinateur. Les surfaces relatives des composantes secondaires ont été calculées en utilisant la méthode itérative de Gauss, puis à partir des surfaces des structures secondaires et de surface globale de l'enveloppe de l'amide I nous avons déterminé les pourcentages des différentes structures (hélice- α , feuillet- β , structure non identifiée). Il est important de rappeler que dans cette étude nous avons soustrait la bande de D_2O , mais pas les bandes de Chl (voir section 4.4), de nos spectres selon le critère de la section (2.3.1.b). De plus, nous avons reproduit avec une approximation raisonnable l'enveloppe originale de la bande amide I à partir des enveloppes des composantes secondaires, et ceci pour tous les spectres que nous avons utilisés. Le cycle est répété plusieurs fois, si nécessaire, jusqu'à ce que la marge d'erreur entre l'enveloppe originale et celle ajustée est minimale.

Les bandes obtenues par simulation spectrale du PSII et du complexe PSII-DGDG sont représentées sur la Figure 4.7, et un résumé des fréquences maximales (ν_{max}) et de l'intensité des bandes est donnée dans le Tableau 4.3. En bref, dans le cas du PSII pur la bande

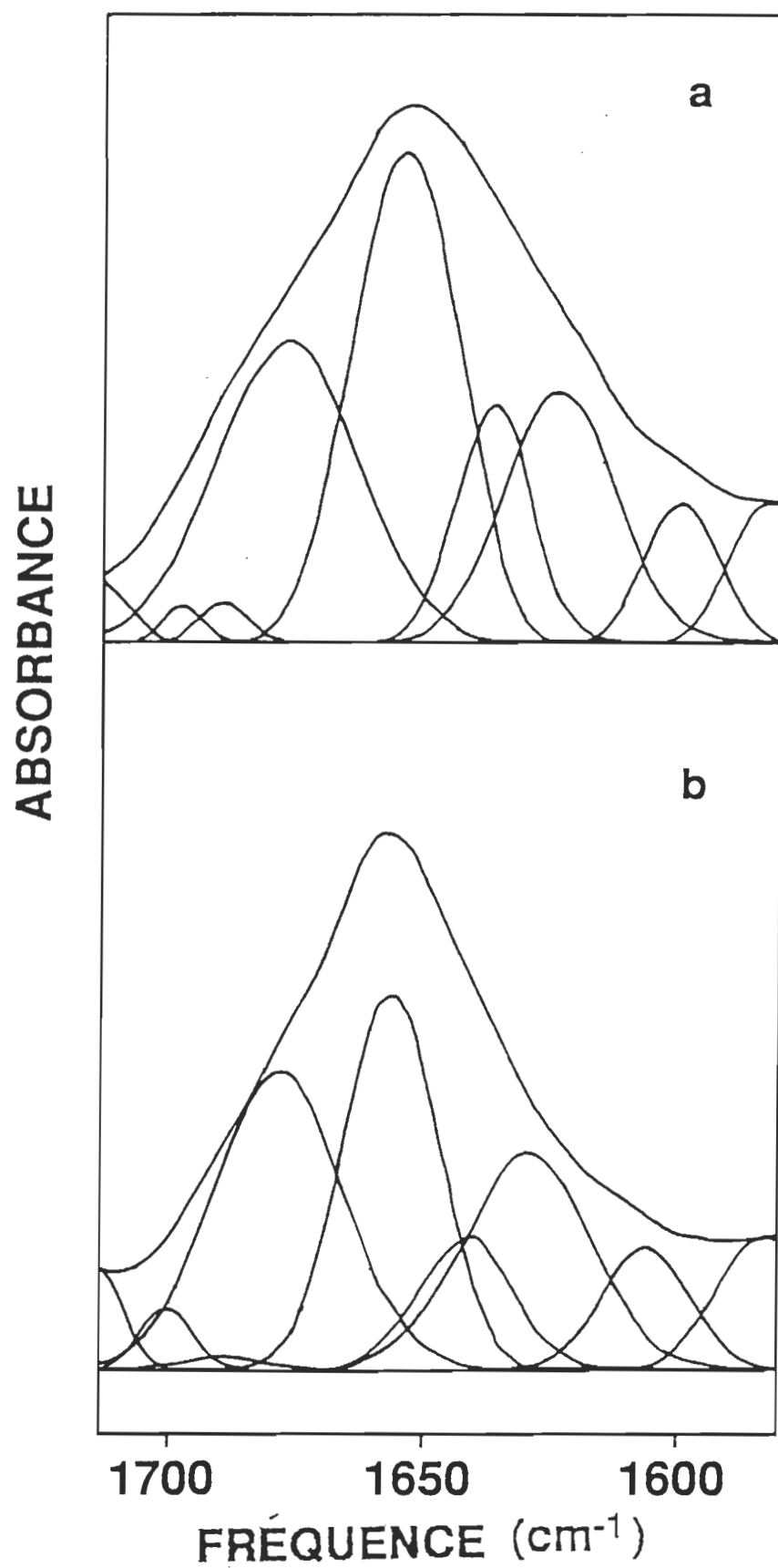


Figure 4.7 Simulation spectrale de la région de l'amide I du PSII

(a) et du complexe PSII-DGDG (b)

Tableau 4.3. Résumé des bandes détectées par simulation spectrale

Bandes	PSII		PSII-DGDG		Attribution	Réf
	ν_{\max}	intensité	ν_{\max}	intensité		
1	1709.8	0.078	1712.0	0.115	NI	1
2	1695.4	0.050	1696.2	0.073	coude- β	2
3	1688.4(1689.3) ^a	0.055	1689.2 (1689.6)	0.015	coude- β	2
4	1677.2 (1677.7)	0.370	1677.4 (1677.5)	0.336	coude- β	3
5	1656.6(1656.6)	0.597	1655.9 (1656.0)	0.422	hélice- α	1
6	1641.0 (1641)	0.295	1641.0 (1641)	0.153	feuillet- β	4
7	1629.0 (1629.5)	0.310	1629.2 (1629.3)	0.247	feuillet- β	3
8	1606.9 (1606)	0.178	1605.7 (1606)	0.143	tyrosine	5
9	1591.9	0.178	1583.1	0.154	NI	1

1. Surewicz et Mantsch, 1988; 2. Byler et Susi, 1986 ; 3. He et al, 1991; 4. Dong et al, 1992; 5. MacDonald et Barry, 1992.

NI: Structure non identifiée

a: Les valeurs entre parenthèse sont les $\bar{\nu}_{\max}$ obtenus à partir des spectres de dérivée seconde.

localisée à 1656.5 cm^{-1} est attribuée à l'hélice- α (He et al, 1991) et les composantes localisées à 1629 cm^{-1} et à 1641 cm^{-1} sont attribuées aux feuillets- β (He et al, 1991; Dong et al, 1992). Récemment la bande située près de 1640 cm^{-1} fut attribuée par certains auteurs au coude- β (Fabian et al, 1992). Les bandes détectées à 1677.2 cm^{-1} , à 1695.4 cm^{-1} et à 1688.4 cm^{-1} sont attribuées au coude- β (He et al, 1991; Byler et Susi, 1986) alors que celle qui est située à 1606.9 cm^{-1} fut attribuée à la tyrosine (Mac Donald et Barry, 1992). Par ailleurs, les structures qui n'appartiennent ni aux feuillets- β ni aux coudes- β sont considérées des structures non ordonnées. Les fréquences de ces bandes d'absorption restent pratiquement stables lors de la complexation des particules du PSII avec le DGDG (Tableau 4.3). En présence des sels, ces bandes subissent des déplacements vers les basses fréquences plus ou moins perceptibles, des déplacements plus importants de 4.5 cm^{-1} et de 2.5 cm^{-1} sont observés respectivement dans les bandes 6 et 7 de la composante de la structure en feuillet- β quand le milieu réactionnel contient 12 mM MgCl_2 (Figures 4.8b et 4.7b). Toutefois, il se révèle intéressant de constater que dans la Figure 4.8b les bandes numéros 1, 2, 3 ne disparaissent pas en présence des sels mais c'est seulement leur intensité qui devient faible (de l'ordre de 0.002).

Pour le PSII pur, nous avons trouvé que la bande attribuée à l'hélice- α constitue 31% de la surface globale de l'enveloppe. Par ailleurs, les composantes des feuillets et coudes- β constituent respectivement 18% et 27% de la même surface globale (Tableau 4.4).

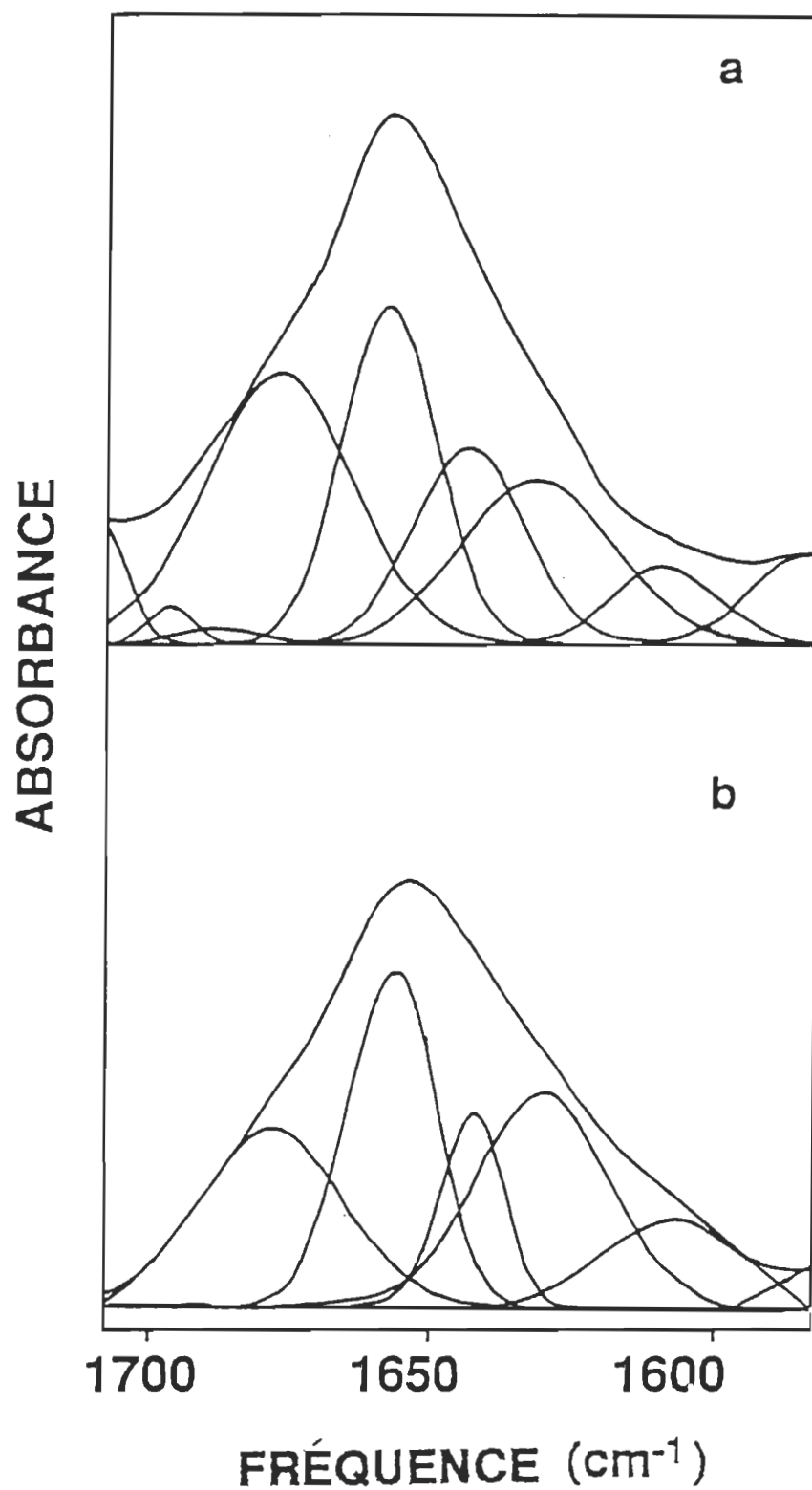


Figure 4.8 Simulation spectrale de la région de l'amide I du complexe PSII-DGDG en présence de (a) 4 mM CaCl₂; (b) 12 mM MgCl₂

Tableau 4.4 Effet de sels sur les pourcentages des structures de l'amide I du PSII-DGDG.

Attribution des bandes	PSII	PSII-DGDG		
		0 mM	4 mM CaCl ₂	12 mM MgCl ₂
Hélice- α	31 \pm 1.2*	24 \pm 0.3	25 \pm 0.5	26 \pm 0.2
Feuillet- β	18 \pm 0.7	20 \pm 0.5	19 \pm 0.4	26 \pm 0.3
Coude- β	27 \pm 0.5	28 \pm 0.6	26 \pm 0.3	23 \pm 0.5
Structure non identifiée	24 \pm 0.8	28 \pm 0.8	30 \pm 1.1	25 \pm 0.7

* écart type.

Après complexation des particules du PSII avec le DGDG, le pourcentage de l'hélice- α occupe seulement 24% (une perte de 7%) de la surface totale de l'enveloppe de l'amide I, alors que le pourcentage des feuillets- β et de coudes- β restent pratiquement stables. Par ailleurs, la structure non ordonnée augmente de 4% au détriment de l'hélice- α . Ces modifications conformationnelles deviennent importantes en présence de Mg^{2+} (Menikh et Fragata, 1994). Les effets des ions sont observés surtout au niveau des pourcentages des feuillets- β (augmentation de 6%) et des coudes- β (diminution de 5%), ce qui suggère que les sites d'interaction de ces cations sont probablement situés dans les feuillets- β à cause de déplacement des bandes de cette composante vers les basses fréquences (Figure 4.8). Notons que les résultats de mesure de cette partie de travail est la moyenne de deux expériences différentes.

4.4. Discussion

Il est maintenant devenu évident que le lipide neutre stimule l'activité du dégagement d'oxygène des particules de PSII lorsqu'elles sont incubées avec les vésicules du DGDG. Cette activité est observée par de faibles rapports de DGDG/Chl et diminue lorsque la quantité de lipide augmente par rapport à la concentration de chlorophylle.

La perte d'activité du dégagement d'oxygène pour des rapports élevés de DGDG/Chl est la conséquence de la diminution de la concentration des protéines (18 kD, 23 kD et 33 kD) responsables de l'activité photosynthétique (Fragata et menikh, 1994). Ce fait a été

également observé dans des membranes préformées avec des phospholipides, et a été attribué à l'inhibition du transport d'électrons (Millner et al, 1983) qui se traduit par une perte d'activité du dégagement d'oxygène (Fragata et al, 1994).

L'addition du $MgCl_2$ au milieu d'incubation à des concentrations supérieures à la concentration critique d'agrégation des vésicules lipidiques peut contrecarrer, en partie, l'effet de la dilution provoqué par la présence de la forte concentration du DGDG. Ce phénomène peut s'expliquer par la neutralisation des forces répulsives d'hydratation qui pourraient empêcher la diffusion des unités du PSII à travers la matrice lipidique. Nos résultats confirment les résultats de Fragata et son équipe (1991), selon lesquels la présence du $MgCl_2$ dans le milieu d'incubation peut diminuer l'effet inhibiteur de la forte concentration du PG dans le complexe PSII-PG. Par contre, l'effet stimulateur de ce lipide non-ionique s'explique par la modification de la conformation structurale des polypeptides de PSII. Des travaux en spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier viennent confirmer cette hypothèse, en montrant des changements de conformation hélicoïdale au niveau des polypeptides de PSII lorsqu'ils sont en présence du DGDG avec et sans sel.

Dans ce travail nous avons utilisé deux techniques pour quantifier les différences dans la bande amide I. La première est qualitative et consiste à localiser les fréquences des structures secondaires de la bande amide I. La seconde approche est quantitative et consiste à déterminer le pourcentage de la structure secondaire des protéines. Nous avons estimé que 31% des protéines du PSII

adoptent la structure de l'hélice- α , 18% sont arrangées en feuillets- β et 27 % adoptent la configuration du coude- β . Lors de la complexation des particules de PSII avec le DGDG les pourcentages de ces structures sont affectés. La structure en hélice- α est considérablement réduite en faveur de la structure non-ordonnée. Ces observations sont en parfaite concordance avec d'autres travaux (He et al, 1991) selon lesquels la structure secondaire des protéines du centre réactionnel de PSII est affectée par la lumière blanche.

Des études récentes (Surewicz et al, 1987) ont rapporté également que l'interaction de la myéline avec le DMPG altère significativement la structure secondaire des protéines. En se basant sur des données spectroscopiques, les auteurs suggèrent que la composante principale adoptée par la myéline après complexation avec le DMPG, n'est plus l'hélice- α mais le feuillet- β . Par ailleurs, des études sur l'interaction lipide-protéine dans les bicouches et liposomes ont montré qu'à la suite de leur complexation avec les lipides, plusieurs peptides biologiquement actifs subissent des changements conformationnels importants allant de structures désordonnées à des structures ordonnées principalement en hélice- α (Kaiser et Kézdi, 1987; Demel et al, 1990). De plus, d'autres études sur la dénaturation des protéines dans un milieu acide ou par les températures élevées ont montré que celles-ci manifestent dans ces conditions des changements conformationnels marqués de structure en hélices- α à des structures principalement de type β (Parker, 1983).

Nous pensons que l'interaction des sels avec les charges des protéines produit une réorganisation de l'architecture moléculaire de ces dernières. Dans ce sens, nous avons constaté des modifications spectrales appréciables, plus particulièrement, dans les pourcentages des feuillets- β et coudes- β du complexe PSII-DGDG quand le milieu réactionnel contient 12 mM MgCl_2 . Il est important de noter que le Mg^{2+} produit des changements conformationnels importants. Cet effet est probablement dû au faible rayon atomique du Mg^{2+} qui lui confère la liberté d'interagir soit avec le DGDG, ce qui pourrait affecter indirectement la structure de la protéine, soit directement avec les liaisons peptidiques en modifiant l'organisation structurale des protéines. Cependant, il est nécessaire de mentionner que dans cette étude nous ne sommes pas en mesure de connaître si la chlorophylle influence la structure secondaire des protéines. Des recherches sur le sujet, dans le cadre d'une autre étude, pourraient être entreprises afin de saisir les interactions Chl-protéines.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Nous sommes maintenant arrivés à un stade où nous pouvons faire un bilan des principales réalisations effectuées dans cette étude et les perspectives ouvertes pour un proche avenir.

Dans ce travail, nous avons éclairci certains mécanismes qui concernent le comportement des lipides non ioniques. Tout d'abord, l'utilisation conjointe de la technique de la turbidité et de la fluorescence nous a permis de confirmer l'absence de fusion des vésicules lipidiques de DGDG. En effet, les résultats de la réversibilité de la turbidité montrent clairement une suppression presque complète de la turbidité des vésicules du DGDG sous l'effet de 12 mM d'EDTA, ce qui prouve l'absence d'un contact intime entre deux vésicules lipidiques. Dans la même démarche expérimentale, les résultats de la méthode d'encapsulation de fluorophore apportent des arguments en faveur de ce dernier concept en donnant une réponse concluante à ce phénomène. Dans ce contexte, nous avons montré que les cations monovalents et divalents devraient être capables de promouvoir l'empilement de la membrane des thylacoïdes en diminuant les forces répulsives entre les surfaces opposées des lipides et des protéines. Cependant le degré de contribution des forces attractives entre les galactolipides à l'empilement des thylacoïdes restent encore mal connu (Webb et Green, 1991). Les résultats obtenus suggèrent que l'agrégation des vésicules sous

l'effet des sels est la conséquence de la perturbation, totale ou partielle, de la structure organisée des molécules d'eau autour de la tête polaire du lipide. Nos résultats montrent également que le Ca^{2+} baisse plus efficacement la polarité de l'interface DGDG-eau que le Mg^{2+} et expliquent ainsi pourquoi les vésicules de DGDG s'agrègent dans une concentration de Ca^{2+} plus faible que celle de Mg^{2+} .

L'emploi de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier s'est révélé fort avantageux dans l'étude de l'interaction cations-lipide et lipide-lipide. Nous avons observé deux bandes importantes où les fréquences ne sont pas affectées par la présence des sels: la fréquence de groupement CHOH du carbone-6 de l'anomère- α et celle de groupement carbonyle ester.

Dans le but de trouver un modèle qui nous permettrait de comprendre davantage le mécanisme d'agrégation, sans fusion (voir discussion dans la section 3.4), nous avons conçu d'une manière théorique et par traitement numérique la configuration correspondant à l'énergie minimale de la molécule du DGDG. Le modèle présenté dans ce travail propose une liaison hydrogène entre l'hydroxyle de carbone 6 de l'anomère- α du galactose avec l'ester $\text{sn}2$. Malgré le fait que notre modèle est élaboré dans le vide, il donne des résultats qui sembleraient appuyer les travaux de McDaniel (1988) selon lesquels le résidu de digalactosyl est situé parallèlement au plan de la bicouche lipidique. Une information supplémentaire fournie par cette disposition est que les groupements hydroxyles de la tête de lipide, qui sont des structures très polaires, peuvent très bien former des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau. L'effet des cations

consiste à modifier l'agencement de ces molécules, qui se traduit par une dissipation de la barrière énergétique d'hydratation à l'interface, entraînant un rapprochement entre les vésicules lipidiques. Les résultats des mesures de la grosseur de la tête polaire du DGDG tirés de ce modèle sont aussi en accord avec plusieurs travaux (Bishop et al, 1980; Marra, 1985).

Nous avons aussi effectué une étude de l'effet du DGDG sur l'activité photosynthétique par le biais de la mesure du dégagement d'oxygène. Plus particulièrement, une stimulation de l'activité photosynthétique a été observée pour de faibles rapports lipide/Chl, puis une diminution rapide pour une forte concentration du DGDG. La présence du 10 mM MgCl_2 dans le milieu d'incubation peut contrecarrer en partie l'effet inhibiteur de la dilution provoquée par la forte concentration du DGDG. En se basant sur les résultats des spectres FTIR, nous avons constaté un changement conformationnel des particules du PSII en présence du DGDG, qui se traduit par une augmentation de pourcentage des structures non ordonnées aux dépens des hélices- α dont l'importance décroît. En outre, les effets de 12 mM MgCl_2 sur le complexe PSII-DGDG sont observés surtout au niveaux des feuillets et coudes- β .

Finalement, nous voulons mentionner brièvement quelques perspectives que nous pouvons envisager dans ce domaine. Ainsi, afin de mieux cerner la conformation de la tête polaire de lipide dans un environnement plus réaliste, nous proposons l'étude de la minimisation énergétique de la molécule de DGDG dans un milieu contenant le galactolipide et l'eau. Par ailleurs, nous pensons qu'une

étude à l'aide de spectroscopie FTIR avec lumière polarisée (dichroïsme linéaire), devrait permettre de déterminer l'orientation dans l'espace de certains groupements fonctionnels, par exemple les groupements OH. Cela aiderait à comprendre davantage le mécanisme d'interaction lipide-lipide et cations-lipide. D'un autre côté, il nous semble intéressant d'entreprendre une étude par FTIR de l'influence de la Chl sur la structure secondaire des protéines du PSII.

BIBLIOGRAPHIE

- Akabori, K., Imaoka, A. & Toyoshima, Y. The role of lipids and 17-kD protein in enhancing the recovery of O₂ evolution in cholate-treated thylakoid membranes. FEBS Lett., 1984, 173, 36-40.
- Allen, C.F. & Good, N. Acyl lipids in photosynthetic systems. Methods Enzymol., 1971, 23, 523-547.
- Allakhverdiev, S.I., Ahmed, A., Tajmir-Riahi, H.-A., Klimov, V.V., Carpentier, R. Light-induced Fourier transform infrared spectrum of the cation radical P680⁺. FEBS Lett., 1994, 339, 151-154.
- Alvarez, J., Haris, P.I., Lee, D.C. & Chapman, D. Conformational changes in concanavalin A associated with demetallization and α -methylmannose binding studied by Fourier transform infrared spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta, 1987, 1916, 5-12.
- Arnon, D.I. Photosynthetic CO₂ assimilation by chloroplasts: Assertion, refutation, discovery. Trends Biochem. Sci., 1987, 12, 39-42.
- Andréasson, L.E. & Vanngard, T. Electron transport in photosystem I and II. Ann. Rev. Plant Physiol., 1988, 39, 379-411.
- Azfall, S., Tesler, W.J., Blessing, S.K., Collins, J.M., Lis, L.J. Hydration force between phosphatidylcholine surfaces in aqueous electrolyte solutions. J. Colloid Interface Sci., 1984, 97, 303-307.
- Bandekar, J. Amide modes and protein conformation. Biochim. Biophys. Acta, 1992, 1120, 123-143.
- Barber, J. Membrane surface charges and potentials in relation to photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 594, 253-308.

- Barber, J. Influence of surface charges on thylakoid structure and function. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1982, 33, 261-295.
- Barber, J. Photosynthetic reaction centres: A common link. *Trends Biochem. Sci.*, 1987, 2, 321-326.
- Bellamy, L.J. The infrared spectra of complex molecules, Y.Yonoue, (ed.), Halsted Press, New York, 1975.
- Berthold, D.A., Babcock, G.T. & Yocum, C.F. A highly resolved oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett.*, 1981, 134, 231-234.
- Berthomieu, C., Boussac, A., Mäntele, W., Breton, J. & Navedryk, E. Molecular changes following oxidoreduction of cytochrome b-559 characterized by Fourier transform infrared difference spectroscopy and electron paramagnetic resonance: Photooxidation in photosystem II and electrochemistry of isolated cytochrome b-559 and iron protoporphyrin IX-bisimidazole model compounds. *Biochemistry*, 1992, 31, 11460-11471.
- Bendall, D.S. Photosynthetic cytochromes of oxygenic organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 683, 119-151.
- Bishop, D.G., Kenrick, J.R., Bayston, J.H., Macpherson, A.S. & Johns, S.R. Monolayer properties of chloroplast lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 602, 248-259.
- Blume, A., Hubner, W. & Messner, G. Fourier transform infrared spectroscopy of $^{13}\text{C}=\text{O}$ labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. *Biochemistry*, 1988, 27, 8239-8249.
- Brasseur, R., De Meutter, J., Goormaghtigh, E. & Ruyschaert, J. M. Mode of organization of galactolipids: A conformational analysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1983, 115, 666-672.
- Bricker, T.M., Odom, W.R. & Queirolo, C.B. Close association of the 33 kD extrinsic protein with the apoprotein of CPa1 in photosystem II. *FEBS Lett.*, 1988, 231, 111-117.

- Burkert, U. & Alinger, N.M. Molecular mechanics; ACS: Washington, 1982.
- Butler, W.L. & Matsuda, H. Possible role of cytochrome b559 in photosystem II. In Oxygen evolving system of photosynthesis, Y.Yonue, (ed.). Academic Press, Tokyo, 1983, pp. 113-122.
- Byler, D.M. & Susi, H. Examination of secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. Biopolymers, 1986, 25, 469-487.
- Camm, E.L. & Green, B.R. Fractionation of thylakoid membranes with the nonionic detergent octyl- β -D-glucopyranoside. Plant Physiol., 1980, 66, 428-432.
- Camm, E.L. & Green B.R. Isolation of PSII reaction center and its relationship to the minor chlorophyll-protein complexes. J. Cell. Biochem., 1983, 23, 171-179.
- Cammarata, K., Tamura, N., Sayre, R. & Cheniae, G. Identification of polypeptides essential for oxygen evolution by extraction and mutational analyses. In Advances in Photosynthesis Research, C. Sybesma, (ed.). Academic Press, The Hague, Boston, Lancaster, 1984,1, pp. 311-320.
- Carpentier, R., Dijkmanns, H., Leblanc, R.M. & Aghion, J. Chlorophyll-a in unilamellar vesicles made with chloroplast lipids. Absorbance and photobleaching. Photochem. Photobiol., 1983, 5, 245-252.
- Casal, H.L. & Mantsch, H.H. Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 779, 381-401.
- Chapados, C. Infrared study of the C-H stretching bands of chlorophyll a and of chlorophyll b in monolayers. Biophys. Chem., 1985, 21, 227-242.
- Chapados, C., Beliveau, J., Trudel, M. & Levesque, C. Comparison of resolution enhancement by different computer technique of the chlorophyll carbonyls. Appl. Spectrosc., 1986, 40, 773-738.

- Chapados, C., Lemieux, S. & Carpentier, R. Infrared study of a photosystem II submembrane preparation. *Curr. Res Photosynth.*, 1990, 1, 343-346.
- Chapados, C., Lemieux, S. & Carpentier, R. Protein and chlorophyll in photosystem II probed by infrared spectroscopy. *Biophys. Chem.*, 1991, 39, 225-239.
- Cheniae, G. Manganese binding sites and presumed manganese proteins in chloroplasts. *Methods Enzymol.*, 1980, 221, 69-74.
- Chirgadze, Y.N., Fedorov, O.V. & Trushina, N.P. Estimation of amino acid residue side-chain. Absorption in the infrared spectra of protein solution in heavy water. *Biopolymers*, 1975, 14, 679-694.
- Cohen, J.A. & Cohen, M. Adsorption of monovalent and divalent cations by phospholipid membranes. *Biophys. J.*, 1981, 320, 623-651.
- Day, E.P., Kwok, A.Y.W., Hark, S.K., Ho, J.T., Vail, W.J., Bentz, J. & Nir, S. Reversibility of sodium-induced aggregation of sonicated phosphatidylserine vesicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, 4026-4029.
- Demel, R.A., Goormaghtigh, E. & de Kruijff, B. Lipid and peptide specificities in signal peptide-lipid interactions in model membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1027, 155-162.
- Dong, A., Caughey, B., Caughey, W.S., Bhat, K.S. & Coe, J.E. Secondary structure of pentaxin female protein in water determined by infrared spectroscopy: Effect of calcium. *Biochemistry*, 1992, 31, 9364-9370.
- Dong, A., Huang, P. & Caughey, W.S. Redox-dependent changes in β -extended chain and turn structures of cytochrome c in water solution determined by second derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry*, 1992, 31, 182-189.
- Dong, A., Huang, P. & Caughey, W.S. Protein secondary structures in water from second derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry*, 1990, 29, 3303-3308.

- Dousseau, F. & Pézolet, M. Determination of secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparison between classical and partial least-squares methods. *Biochemistry*, 1990, 29, 8771-8779.
- Doyle, B.B., Bendit, E.G. & Blout, E.R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers*, 1975, 14, 937-957.
- Düzgünes, N. Membrane fusion. In *Subcellular biochemistry*, D.B. Rodyn, (ed.). Plenum Press, New York, 1985, 11, pp. 195-286.
- Düzgünes, N., Allen, T.M., Fedor, J. & Papahadjopoulos, D. Lipid mixing during membrane aggregation and fusion: Why fusion assays disagree. *Biochemistry*, 1987, 26, 8435-8442.
- Düzgünes, N., Nir, S., Wilschut, J., Bentz, J., Newton, C., Portis, A. & Papahadjopoulos, D. Calcium and magnesium-induced fusion of mixed phosphatidylserine/phosphatidylcholine vesicles: Effect of ion binding. *J. Memb. Biol.*, 1981, 59, 115-125.
- Eagland, D. The influence of hydration on the stability of hydrophobic colloidal systems. In *Water a comprehensive Treatise*, F. Franks, (ed.). Plenum Press, New York, 1975, 5, pp. 1-74.
- Eklund, K. Monovalent cation-induced fusion of acidic phospholipid vesicles. *Chem. Phys. Lipids*, 1990, 52, 199-206.
- Fabian, H., Naumann, D., Misselwitz, R., Ristau, O; Gerlach, D. & Welfe, H. Secondary structure of streptokinase in aqueous solution: A Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochemistry*, 1992, 31, 6532-6538.
- Fookson, J. & Wallach, D.F.H. Structural differences among phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and mixed phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine multilayers: An infrared absorption study. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1978, 189, 195-204.
- Fragata, M., Menikh, A. & Robert, S. Salt-mediated effects in non-

- ionic lipid bilayers constituted of digalactosyldiacylglycerol studied by FTIR spectroscopy and molecular modellization. *J. Phys. Chem.*, 1993, 97, 13920-13926.
- Fragata, M. Menikh, A. & Nénonéné, E.K. Functional and structural aspects of the thylakoid lipids in oxygen evolution in photosystem II. *Trends Photochem. Photobiol.*, 1994 (in print).
- Fragata, M., Strzalka, K. & Nénonéné, E.K. $MgCl_2$ -induced reversal of oxygen evolution decay in photosystem II particles incubated with phosphatidylglycerol vesicles at high lipid/photosystem II ratio. *J. Photochem. Photobiol.*, 1991, 11, 329-342.
- Fringeli, U.P. & Günthard, H.H. Infrared membrane spectroscopy. In *Membrane Spectroscopy*, E. Grell, (ed.). Plenum Press, Berlin, Heidelberg, New York, 1981, 31, pp. 270-332.
- Fujiwara, M. & Tasumi, M. Resonance raman and infrared studies on axial coordination to chlorophylls a and b in vitro. *J. Phys. Chem.*, 1986, 90, 250-255.
- Gallant, J. Purification des lipides du chloroplaste par chromatographie liquide à haute performance et études spectroscopiques de mélanges chlorophylles-a/lipides à l'état monomoléculaire. Thèse de maîtrise en biophysique, UQTR Février, 1990.
- Genzel, L., Santo, L. & Shen, S.C. Far-infrared spectroscopy of biomolecules. In *Spectroscopy of biological molecules*, C. Sandorfy and T. Theophanides, (eds.). Academic Press, New York, 1984, pp. 609-619.
- Gerwert, K., Hess, B., Michel, H. & Buchanan, S. FTIR studies on crystals of photosynthetic reaction centers. *FEBS Lett.*, 1988, 2, 303-307.
- Glaeser, R.M., Downing, K.H. & Jap, B.K. What spectroscopy can still tell us about the secondary structure of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 1991, 59, 934-938.
- Gounaris, K., Whitford, D. & Barber, J. The effect of thylakoid lipids on

- an oxygen-evolving photosystem II preparation. *FEBS Lett.*, 1983, 163, 320-234.
- Govindjee, K.T. & Coleman, W. The electron donor side of photosystem II: The oxygen evolving complex. *Photochem. Photobiol.*, 1985, 42, 187-210.
- Govindjee, K.T. & Coleman, W. La production d'oxygène par les plantes. *Pour la Science*, 1990, 150, 42-49.
- Gruen, D.W.R., Macelja, S. & Parsegian, V.A. Water structure near the membrane surface, F.Wiegel (ed.). Academic Press, New York, 1984, pp. 59-91.
- Gruner, S.M., Cullis, P.R., Hope, M.J. & Tilcock, C.P.S. Lipid polymorphism: the molecular basis of nonbilayer phases. *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, 1985, 14, 211-217.
- Hader, D.J. & Tevini, M. Photosynthesis, General Photobiology, F. Frank, (ed.). Pergamon Press, Toronto, 1987, pp. 112-165.
- Hansson, Ö. & Wydrzynski, T. Current perceptions of photosystem II. *Photosynth. Res.*, 1990, 23, 131-162.
- He, W.Z., William, R.N., Parvez, I.H., Chapman, D. & Barber, J. Protein secondary structure of isolated photosystem II reaction center and conformational changes studies by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 1991, 30, 4552-4559.
- Homann, P.H. The relations between the chloride, calcium and polypeptide requirements of photosynthetic water oxidation. *J. Bioenerg. Biochem.*, 1987, 19, 105-123.
- Hoober, J.K. Chloroplasts, Y.Inoue, (eds). Plenum Press, New York, 1984, pp. 20-89.
- Huang, C. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 1969, 8, 344-352.
- Huner, N.P.A., Krol, M., Williams, J.P., Maissan, E., Low, P.S., Roberts, D. & Thomson, J.E. Low temperature development induces a

- specific decrease in trans-3-hexadecenoic acid content which influences LHCII organization. *Plant Physiol.*, 1987, 84, 12-18.
- Israelachvili, J.N. Intermolecular and surface forces with applications to colloidal and biological systems, S.Mclaughlin (ed.). Academic Press. London, 1985.
- Jordon, B.R., Chow, W.S. & Barker, A.J. The role of phospholipids in the molecular organisation of pea chloroplast membranes. Effect of phospholipid depletion on photosynthetic activities. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 725, 77-86.
- Kaiser, E.T. & Kézdi, F.J. Peptides with affinity for membranes. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 1987, 16, 561-581.
- Kennedy, D.F., Slotboom, A.J., de Haas, G.H. & Chapman, D. Fourier transform infrared spectroscopic (FTIR) study of porcine and bovine pancreatic phospholipase A₂ and their interaction with substrate analogues and a transition-state inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1040, 317-326.
- Kozlov, M.M., Leikin, S.L., Chernomordik, L.V., Markin, V.S. & Chizmdzhev, Y.A. Salt mechanism of vesicle fusion. Intermixing of aqueous contents. *Eur. Biophys. J.*, 1989, 17, 121-129.
- Krimm, S. & Bandekar, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. In *Advances in Protein Chemistry*. C.B. Anfinsen, J.T. Edsall and F.M. Richards (eds.). Academic Press, Orlando, San Diego, New York, 1986, 38, pp. 181-364.
- Lau, A., Mclaughlin, A. & Mclaughlin, S. The absorption of divalent cations to phosphatidylglycerol bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 645, 279-292.
- Leonhard, M., Nabadryk, E., Bergeron, G., Breton, J. & Mäntele, W. Model compound studies of pigments involved in photosynthetic energy conversion: Infrared-spectroelectrochemistry of chlorophylls and pheophytins. *Curr. Res Photosynth.*, 1990, 1, 89-92.
- Lewis, R.N.A.H. & McElhaney, R.N. Structures of the subgel phases of N-saturated diacylphosphatidylcholine bilayers. FTIR

- spectroscopic studies of $^{13}\text{C}=\text{O}$ and ^2H labeled lipids. *Biophys. J.*, 1992, 61, 63-77.
- Lewis, R.N.A.H. & McElhaney, R.N. Studies of mixed-chain diacyl phosphatidylcholines with highly asymmetric acyl chains: A Fourier transform infrared spectroscopic study of interfacial hydration and hydrocarbon chain packing in the mixed interdigitated gel phase. *Biophys. J.*, 1993, 65, 1866-1877.
- L'Heureux, G.P. & Fragata, M. Micropolarities of lipid bilayers and micelles: Dielectric constant determinations of unilamellar phosphatidylcholine vesicles with the probes pyrene and 16-(1-pyrenyl) hexadecanoic acid. *J. Colloid Interface Sci.*, 1987, 117, 513-521.
- Lessard, J.G. & Fragata, M. Micropolarities of lipid bilayers and micelles.3. Effect of monovalent ions on the dielectric constant of the water-membrane interface of unilamellar phosphatidylcholine vesicles. *J. Phys. Chem.*, 1986, 90, 811-817.
- Letterier, F. & Marie, C. *Biologie Membranaire. Structure et dynamique des membranes biologiques*, Hermann, Éditeurs des sciences et des Arts, Paris, 1989.
- Liao, M. & Prestegard, J.H. Fusion of phosphatidic acid phosphatidylcholine mixed lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 550, 157-173.
- Lutz, M. In *Advanced in Infrared and Raman Spectroscopy*, R.J.H. Clark, , R.E. Hester, (eds.). Wiley Heyden, London, 1984, 11, 211-300.
- MacDonald, G.M. & Barry, B.A. Difference FT-IR study of novel biochemical preparation of photosystem II. *Biochemistry*, 1992, 31, 9848-9856.
- Mannock, D.A., Lewis, R.N.A.H. & McElhaney, R.N. An improved procedure for the preparation of 1,2-di-O-acyl-3-O-(β -D-glucopyranosyl)-sn-glycerols. *Chem. Phys. Lipids*, 1987, 43, 113-127.
- Mannock, D.A., Lewis, R.N.A.H. & McElhaney, R.N. The chemical synthesis and physical characterization of 1,2-di-O-acyl-3-O-

- (α -D-glucopyranosyl)-sn-glycerols, an important class of membrane glycolipids. *Chem. Phys. Lipids*, 1990, 55, 309-321.
- Mantsch, H.H., Martin, A. & Cameron, D.G. Characterization by infrared spectroscopy of the bilayer to non bilayer phase transition of phosphatidylethanolamines. *Biochemistry*, 1981, 20, 3138-3145.
- Marchessault, R.H. & Liang, C.Y. Infrared spectra of crystalline polysaccharides. *J. Polymer. Sci.*, 1962, 59, 357-378.
- Marra, J. Controlled deposition of lipid monolayers and bilayers on to mica and direct force measurements between galactolipid bilayers in aqueous solutions. *J. Colloid Interface Sci.*, 1985, 107, 446-458.
- Marra, J. Direct measurement of attractive van der Waals and adhesion forces between uncharged lipid bilayers in aqueous solutions. *J. Colloid Interface Sc.*, 1986, 109, 11-20.
- Mataga, N. Molecular interactions and electronic spectra, D. Marcel (ed). Academic Press, New York, 1970, pp. 171-200.
- McDonnel, A. & Staehelin, L.A. Adhesion between liposomes mediated by the chlorophyll a/b light-harvesting complex isolated from chloroplast membranes, *J.Cell.Biol.*, 1980, 84, 40-56.
- McDaniel, R.V. Neutron diffraction studies of digalactosyldiacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 940, 158-164.
- Melis, A. & Ow, R.A. Photoconversion kinetics of chloroplast photosystem I and II. Effect of Mg^{2+} . *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 682, 1-10.
- Menikh, A. & Fragata, M. Fourier transform infrared spectroscopic study of ion binding and intermolecular interactions in the polar head of digalactosyldiacylglycerol and divalent cations. *Eur. Biophys. J.*, 1993, 22, 249-258.
- Menikh, A. & Fragata, M. Protein secondary structure of the photosystem II complex studied by FTIR spectroscopy. Changes in the amide I region mediated by digalactosyldiacyl-

- glycerol and divalent cations. *J. Mol. Struct.*, 1994, 319, 101-107.
- Miyao, M. & Inoue, Y. An improved procedure for photoactivation of photosynthetic oxygen evolution: Effect of artificial electron acceptors on the photoactivation yield of NH_2OH treated wheat photosystem II membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1056, 47-56.
- Millner, P.A., Grouzis, J.P., Chapman, D.J. & Barber, J. Lipid enrichment of thylakoid membranes.I. Using soybean phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 722, 331-340.
- Morita, E.H., Hayashi, H. & Tasumi, M. Temperature dependance of light-induced infrared difference spectra of chromatophores and reaction centers from photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, 1142, 146-154.
- Murakami, S. & Packer, L. Protonation and chloroplast membrane structure. *J. Cell. Biol.*, 1970, 47, 332-351.
- Murata, N., Higashi, S.I. & Fujimura, Y. Glycerolipids in various preparations of photosystem II from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1019, 261-268.
- Murata, N., Miyao, O.T., Matsunami, H. & Kuwabara, T. Stoichiometry of components in the oxygen evolution system of photosystem II particles prepared with Triton X-100 from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 765, 363-369.
- Murphy, D.J. The molecular organization of photosynthetic membranes of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 864, 33-94.
- Murphy, D.J. & Woodrow, I.E. The lateral segregation model. *Biosynthesis and function of plant lipids*. Thomson, Mudd and Gibbs (eds.). American Society of Plant Physiologists, 1983, pp. 104-125.
- Mushayakarara, E., Albon, N. & Levin, I.W. Effect of water on the molecular structure of a phsphatidylcholine hydrate. Raman spectroscopy analysis of the phosphate, carbonyl and carbon-

- hydrogen stretching mode regions of 1,2 dipalmitoyl-phosphatidylcholine dihydrate. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 686, 153-159.
- Mushayakarara, E., Wong, P.T.T. & Mantsch, H.H. Detection by high pressure infrared spectroscopy of hydrogen bonding between water and triacylglycerol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 134, 140-145.
- Nabedryk, E., Andrianambinintsoa, S., Berger, G., Leonhard, M., Mäntele, W. & Breton, J. Characterization of bonding interactions of the intermediary electron acceptor in the reaction center of photosystem II by FTIR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, 1016, 49-54.
- Nabedryk, E., Goldman, E., Robles, S.J., Youvan, D.C. & Breton. Spectroscopy of biological molecules, T.Theophanides and al, (eds.). Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, 1993, pp. 311-312.
- Nabedryk, E., Robles, S.J., Goldman, E., Youvan, D. & Breton, J. Probing the primary donor environment in the histidine^{M200}-leucine and histidine^{L173}-leucine heterodimer mutants of rhodobacter capsulatus by light-induced Fourier transform infrared difference spectroscopy. *Biochemistry*, 1992, 31, 10852-10858.
- Nakatani, H.Y., Barber, J. & Minski, M.J. The influence of thylakoid membrane surface properties on the distribution of ions in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 545, 24-25.
- Nénonéné, K.E. Effet du phosphatidylglycérol et des cations mono-et divalents dans la formation et l'activité des complexes lipides-polypeptides du photosystème II. Thèse du doctorat en Biophysique, UQTR, 1992.
- Nénonéné, E.K. & Fragata, M. Effects of pH and freeze-thaw on photosynthetic oxygen evolution of photosystem II particles incorporated into phosphatidylglycerol bilayers, *J. Plant Physiol.*, 1990, 136, 615-620.
- Nir, S., Benz, J., Wilschut, J. & Düzgünes, N. Aggregation and fusion of phospholipid vesicles. *Prog. Surf. Sci.*, 1983, 13, 1-124.

- Ohki, S.A. Mechanism of divalent ion-induced phosphatidylserine membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 689, 1-11.
- Ort, D.R. Energy transduction in oxygenic photosynthesis: An overview of structure and mechanism. In *Photosynthesis III. Photosynthetic Membranes and Light Systems. Encyclopedia of Plant Physiology*, A. Pirson and M.H. Zimmermann, (eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1986, 19, pp.143-196.
- Ortega, J.M., Hervas, M. & Losada, M. Location of cytochrome b-559 between photosystem II and photosystem I in non cyclic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, 975, 244-251.
- Pacher, K.G., Matlok, F. & Gremlich, H.U. *Merck FT-IR Atlas. A collection of FT-IR spectra.* Merck (ed.), Darmstadt, 1988.
- Painter, P.C., Coleman, M.M. & Koenig, J.L. *The theory of vibrational spectroscopy and its applications to polymeric materials.* Wiley-Interscience, New York, 1982.
- Papahajopoulos, D., Nir, S. & Düzgünes, N. Molecular mechanisms of calcium-induced membrane fusion. *Bioenerg. Biomembr. J.*, 1990, 22, 157-179.
- Parker, F.S. *Applications of infrared spectroscopy in biochemistry, biology and medicine*, Y.Yonoue (ed.). Plenum Press, New York, 1971.
- Parker, F.S. *Applications of infrared, raman and resonance raman spectroscopy in biochemistry*, F.Frank (ed.). Plenum Press, New York, 1983, pp. 55.
- Rawlyer, A., Unitt, M.D., Giroud, C., Davies, H., Mayor, J. P., Harwood, J.L. & Siegenthaler, P.-A. The transmembrane distribution of galactolipids in chloroplast thylakoids is universal in a wide variety of temperate climate plants. *Photosynth. Res.*, 1987, 11, 3-13.
- Richardson, J.S. & Richardson, D.C. Principales and patterns of protein conformation. In *Prediction of Protein Structure and the principles of Protein Conformation*, G.D. Fasman (ed.). Plenum

Press, New York, London, 1989, 1-98.

Rosenbaum, E.J. Physical chemistry. Appleton-Century-Crofts. Publisher. Educational Division, Meredith Co, New York, 1970, pp 205.

Shechter, E. Biochimie et Biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels. Edition, Masson, Paris, 1990, pp. 28-74.

Schulman, S.G. Molecular luminescence spectroscopy. Method and Application: Part 1. Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. Chemical Analysis, 1985.

Siefermann, H.D., Ross, J.W., Kaneshiro, K.H. & Yamamoto, H.Y. Reconstitution by monogalactosyldiacylglycerol of energy transfer from light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex to the photosystems in Triton X-100 solubilized thylakoids FEBS Lett., 1982, 149, 181-196.

Siegenthaler, P-A., Rawyler, A. & Giroud, C. Spatial organization and functional roles of acyl lipids in thylakoid membrane. In Metabolism, Structure and Function of Plant Lipids, P.K. Stumpf, J.B. Mud and W.D. Nes (eds.). Plenum Press, New York, 1987, pp. 161-168.

Siegenthaler, P-A., Rawyler, A. & Smutny, J. The phospholipid population which sustains the uncoupled non-cyclic electron flow activity is localized in the inner monolayer of the thylakoid membrane. Biochim. Biophys. Acta, 1989, 975, 104-111.

Sprague, S.G. Structural and functional consequences of galactolipids on thylakoid membrane organization. J Bioenerg. Biomemb., 1987, 19, 691-703.

Sprague, S.G., Camm, E.L., Green, B.R. & Staehelin, L.A. Reconstitution of light-harvesting complexes and photosystem II cores into galactolipid and phospholipid liposomes. J. Cell Biol., 1985, 100, 52-557.

- Sprague, S.G. & Staehelin, A. Effects of reconstitution method on the structural organization of isolated chloroplast membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 777, 306-332.
- Staehelin, L.A. Reversible particle movements associated with unstacking and restacking of chloroplast membrane in vitro. *J. Cell. Biol.*, 1976, 76, 136-158.
- Staehelin, L.A. & Arntzen, C.J. Regulation of chloroplast membrane function: Protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components. *Cell. Biol.*, 1983, 97, 1327-1337.
- Starzak, M.E. The physical chemistry of membranes. Inoue, Y (ed.). Academic Press, New York, 1984.
- Surewicz, W.K. & Mantsch, H.H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 952, 115-130.
- Surewicz, W.K., Moscarello, M.A. & Mantsch, H.H. Fourier transform infrared spectroscopic investigation of the interaction between myelin basic protein and dimyristoylphosphatidylglycerol bilayers. *Biochemistry*, 1987, 26, 3881-3886.
- Tajmir-Riahi, H.A. Carbohydrate adducts with zinc-group-metal ions. Interaction of β -D-fructose with Zn(II), Cd(II), and Hg (II) cations, and the effects of metal-ion coordination on the sugar isomer binding. *Carbohydrate Res.*, 1988a, 172, 1-10.
- Tajmir-Riahi, H.A. Interaction of D-glucose with alkaline-earth metal ions. Synthesis, spectroscopic, and structural characterization of Mg (II)-and Ca (II)-D-glucose adducts and the effect of metal-ion binding on anomeric configuration of the sugar. *Carbohydrate Res.*, 1988b, 183, 35-46.
- Tajmir-Riahi, H.A., Ahmed, A. Complexation of copper and zinc ions with proteins of a light-harvesting complex (LHC-II) of chloroplast thylakoid membranes studied by FTIR spectroscopy. *J. Mol. Struct.*, 1993, 297, 103-108.
- Tanford, C. The Hydrophobic effect, Y. Inoue (ed.). Wiley, New York.

1980.

- Tavittian, B.A., Navedryk, E., Mäntele, W. & Breton, J. Light-induced Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic investigations of primary reactions in photosystem I and photosystem II. *FEBS Lett.*, 1986, 201, 151-157.
- Thompson, L.K. & Brudwing, G.W. Cytochrome b-559 may function to protect photosystem II from photoinhibition. *Biochemistry*, 1988, 27, 6653-6658.
- Tscharner, V.V. & Radda, G.K. The effect of fatty acids on the surface potential of phospholipid vesicles measured by condensed phase radioluminescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, 643, 435-448.
- Tu, A.T. Raman spectroscopy. In *Biology Principles and Applications*. Wiley- interscience publication John. Wiley & sons Inc., New York, Toronto, Singapore, 1982.
- Vinograd, S.N. & Linnell, R.H. Hydrogen bonding, T.Theophanides (ed.) Van Nostrand, Reinhold, New York, 1971.
- Webb, M.S. & Green, B.R. Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1060, 133-158.
- Webb, M.S., Tilcock, C.P.S. & Green, B.R. Salt mediated interactions between vesicles of the thylakoid lipid digalactosyldiacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 938, 323-333.
- Widger, W.R., Cramer, W. A., Hermodson, M. & Herrmann, R.G. Evidence for a hetero-oligomeric structure of the chloroplast cytochrome b-559. *FEBS Lett.*, 1985, 191, 186-190.
- Wilschut, J., Düzgünes, N. & Papahadjopoulos, D. Calcium/Magnesium specificity in membrane fusion: Kinetics of aggregation and fusion of phosphatidylserine vesicles and the role of bilayer curvature. *Biochemistry*, 1981, 20, 3126-3133.
- Wilschut, J. & Hoekstra, D. Membrane fusion: Lipid vesicles as a model system. *Chem. Phys. Lipids*, 1986, 40, 145-166.

- Wilschut, J., Düzgünes, N. & Fraley, R. Studies on the mechanism of membrane fusion: Kinetics of calcium ion induced fusion of phosphatidylserine vesicles followed by a new assay for mixing of aqueous vesicle contents, *Biochemistry*, 1980, 19, 6011-6021.
- Yocum, C.F. Calcium activation of photosynthetic water oxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1059, 1-15.